

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Studium funkce homologu (pro)reninového receptoru v organismu
Caenorhabditis elegans

The study of function of (pro)renin receptor in *Caenorhabditis elegans*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vladimír Zima

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Školitel:

MUDr. Marta Kostrouchová, CSc.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2012

Bc. Vladimír Zima

Poděkování:

Rád bych poděkoval své školitelce MUDr. Martě Kostrouchové, CSc. za její odborné vedení, ochotu a vstřícnost při zpracování diplomového projektu.

Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. děkuji za cenné rady při vypracování diplomové práce a za záštitu, kterou mi poskytla.

Děkuji MUDr. Tomáši Dvořákovi za poskytnutí konstruktů 7270, 7271 a 7272 a Dr. Andrew Firovi za poskytnutí vektorů L4440 a pPD95.75.

Můj dík patří také Haně Prouzové za provádění mikroinjekcí, Františkovi Behenskému za zaškolení do metody qPCR a všem kolegům z laboratoře Modelových systémů 1. LF UK za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

Abstrakt

Proreninový receptor (PRR) hraje v lidském organismu důležitou roli. Podílí se na renin-angiotensinovém systému (RAS), který je jedním z hlavních tělesných mechanismů pro udržování stálé koncentrace elektrolytů v plasmě. PRR je využíván jako terapeutický cíl při léčbě hypertenze a dalších s ní souvisejících chorob. Nedávné studie však odhalují funkci PRR v signální dráze označované jako „Wnt“. Wnt dráha je evolučně vysoce konzervovaný proces, nezávislý na RAS, zprostředkující mezibuněčnou komunikaci. Z tohoto důvodu je důležité plně pochopit funkci a možné důsledky blokace PRR. Homolog genu kódujícího lidský PRR byl identifikován v genomu hádátka *C. elegans*. Jedná se o gen nesoucí označení *R03E1.2*. Náplní předkládané diplomové práce je studium funkce genu *R03E1.2* v modelovém organismu *C. elegans*. Exprese *R03E1.2* během vývoje *C. elegans* byla sledována pomocí kvantitativní PCR. Ukázalo se, že gen *R03E1.2* je exprimován během celého vývoje organismu, nejvíce však během larválního vývoje. Lokalizace tkáňové exprese proteinu R03E1.2 *in vivo* byla určena pomocí linií *C. elegans* exprimujících protein R03E1.2 s fluorescenční značkou v podobě zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, z angl. „green fluorescent protein“). Protein R03E1.2 je exprimován zejména v apikální membráně trávicí trubice, slabší exprese však byla zaznamenána i v cytoplasmatických membránách šesti hlavových neuronech. Pomocí post-translačního umlčování genové exprese vyvolaného RNA-interferencí (RNAi) byla navozena ztráta funkce genu *R03E1.2*. Bylo zjištěno, že *R03E1.2* je důležitý během raného larválního vývoje *C. elegans*.

Abstract

Prorenin receptor (PRR) plays in the human organism an important role. It is involved in the renin-angiotensin system (RAS), one of the body's major mechanisms important for maintaining the constant plasma concentration of electrolytes. PRR is being used as a therapeutic target for treatment of hypertension and other related diseases. Interestingly, recent studies suggest that PRR is also involved in the Wnt signalling pathway. The Wnt pathway is RAS-independent, evolutionary conserved processes mediating cell signalling. For these reasons, it is of high importance to have proper understanding of PRR function and possible consequences of its inhibition. A homolog of the gene encoding human PRR was found in the genome of the nematode *C. elegans*. The name of this gene is *R03E1.2*. In this thesis function of the gene *R03E1.2* in the model organism *C. elegans* was studied. Expression of *R03E1.2* during the *C. elegans* development was monitored with the use of quantitative PCR (qPCR). The gene *R03E1.2* is expressed throughout the development of the organism, but primarily during larval development. Localization of the protein R03E1.2 tissue expression *in vivo* was studied with the use of *C. elegans* lines expressing protein R03E1.2 tagged with green fluorescent protein (GFP). The protein R03E1.2 is mainly expressed in the apical membrane of the intestine, but its expression was also detected in the cytoplasmatic membranes of six head neurons. Posttranscriptional gene silencing caused by RNA interference (RNAi) was employed to simulate *R03E1.2* loss of function. It was found that the gene *R03E1.2* is required for proper early larval development. “(In Czech)”

Seznam zkratek

ACE	angiotensin-konvertující enzym (z angl. „angiotensin-converting Enzyme“)
APC	tumor supresorový protein „adenomatous polyposis coli“
BAR-1	homolog β -kateninu v <i>C. elegans</i> (z angl. „beta-catenin/armadillo related“)
cDNA	komplementární DNA (z angl. „complementary DNA“)
CK-1	kaseinová kinasa 1 (z angl. „casein-kinase 1“)
cP	prahový cyklus
dsRNA	dvouvláknová RNA (z angl. „double-stranded RNA“)
DTT	dithiothreitol
Dvl	membránový receptor „dishevelled“
ERK	kinasa regulovaná extracelulárním signálem (z angl. „extracellular signal-regulated kinase“)
fN	normalizační faktor
Fz	membránový receptor „Frizzled“
gDNA	genomická DNA
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. „green fluorescent protein“)
GSK	kinasa glykogensynthasy (z angl. „glycogen synthase kinase“)
HNF4	hepatální jaderný faktor 4 (z angl. „hepatocyte nuclear factor 4“)
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani
LEF	transkripční faktor „lymphoid enhancer-binding factor“
LRP-6	membránový receptor „low density lipoprotein receptor-related protein 6“
MAB-5	transkripční faktor v <i>C. elegans</i> (z angl. „male abnormal“)
MAPK	mitogen-aktivovaná protein-kinasa
NGM	médium pro růst nematod (z angl. „nematod growth medium“)
NHR	jaderný hormonální receptor (z angl. „nuclear hormon receptor“)
pb	pár bází
PBS	fosfátový pufr (z angl. „phosphate buffered saline“)
POP-1	transkripční faktor v <i>C. elegans</i> (z angl. „posterior pharynx defect“)
PRR	proreninový receptor
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce (z angl. „quantitative polymerase chain reaction“)

RISC	RNA-indukovaný umlčovací komplex (z angl. „RNA-induced silencing komplex“)
RNAi	RNA-interference
RnBp	renin-vážíci protein (z angl. „renin-binding protein“)
siRNA	malá interferující RNA (z angl. „small interfering RNA“)
TCF	transkripční faktor „T-cell factor“
UPL	knihovna fluorescenčních sond pro qPCR (z angl. „universal probe library“)
V-ATPasa	vakuolární H ⁺ -ATPasa
VPC	prekurzory vulválních buněk (z angl. „vulval precursor cells“)
WRM-1	homolog β-kateninu v <i>C. elegans</i> (z angl. „worm armadillo“)

Obsah

1.	ÚVOD	10
1.1.	MODELOVÝ ORGANISMUS CAENORHABDITIS ELEGANS.....	10
1.1.1.	Anatomie <i>C. elegans</i>	10
1.1.2.	Životní cyklus <i>C. elegans</i>	12
1.1.3.	Post translační umlčování genové exprese (RNA interference).....	14
1.2.	RENIN ANGIOTENSINOVÝ SYSTÉM U ČLOVĚKA	15
1.2.1.	Komponenty a funkce renin angiotensinového systému	15
1.2.2.	Proreninový receptor	17
1.3.	BUNĚČNÁ SIGNALIZACE „WNT“	20
1.3.1.	Buněčná signalizace „Wnt“ v obratlovcích a hmyzu	20
1.3.2.	Buněčná signalizace „Wnt“ v <i>C. elegans</i>	22
1.3.2.1.	Kanonická signalizace „Wnt“ v <i>C. elegans</i>	22
1.3.2.2.	Nekanonická signalizace „Wnt“ v <i>C. elegans</i>	23
1.4.	STUDIUM PRORENINOVÉHO RECEPTORU V MODELOVÝCH SYSTÉMECH	24
1.4.1.	Proreninový receptor se účastní buněčné signalizace „Wnt“	24
1.4.2.	Proreninový receptor je kofaktorem vakuolární H ⁺ ATPasy.....	25
1.4.3.	V organismu <i>C. elegans</i> je exprese homologu proreninového receptoru řízena pomocí jaderného receptoru NHR 31	25
2.	CÍL PRÁCE	27
3.	MATERIÁL A METODY.....	28
3.1.	MATERIÁL	28
3.1.1.	Biologický materiál	28
3.1.1.1.	Linie <i>C. elegans</i>	28
3.1.1.2.	Bakteriální linie	29
3.1.2.	Vektory.....	29
3.1.3.	Primery.....	30
3.1.4.	Chemikálie.....	30
3.1.5.	Přístroje a vybavení	32
3.2.	METODY	33
3.2.1.	Elektroforéza nukleových kyselin	33
3.2.2.	Fenol/chloroformová extrakce a etanolová precipitace	33
3.2.3.	Příprava synchronní populace <i>C. elegans</i>	33
3.2.4.	Izolace celkové RNA z populace <i>C. elegans</i>	34
3.2.5.	Reverzní transkripce	35
3.2.6.	Kvantitativní polymerasová řetězová reakce (qPCR)	35
3.2.7.	Mikroskopie a lokalizace exprese R03E1.2 pomocí zeleného fluorescenčního proteinu	37
3.2.8.	Příprava bakteriální kultury produkující dvouvláknovou RNA	37
3.2.9.	RNA interference prováděná kultivací populace <i>C. elegans</i> na bakteriální kultuře produkující dvouvláknovou RNA	38
3.2.10.	Příprava dvouvláknové RNA in vitro	38
3.2.11.	RNA interference prováděná injikováním dvouvláknové RNA do dospělých hermafroditů <i>C. elegans</i>	39
3.2.12.	Stanovení změny exprese Wnt cílových genů metodou kvantitativní PCR v populaci <i>C. elegans</i> vystavené RNA interferenci	40
4.	VÝSLEDKY	42
4.1.	IZOLACE RNA ZE SYNCHRONNÍCH POPULACÍ <i>C. ELEGANS</i> V JEDNOTLIVÝCH VÝVOJOVÝCH FÁZÍCH	42
4.2.	EXPRES R03E1.2 V JEDINCÍCH <i>C. ELEGANS</i> V JEDNOTLIVÝCH VÝVOJOVÝCH FÁZÍCH STANOVENÁ METODOU KVANTITATIVNÍ PCR	44
4.3.	LOKALIZACE TKÁŇOVÉ EXPRESY PROTEINU R03E1.2 V <i>C. ELEGANS</i> S VYUŽITÍM ZELENÉHO FLUORESCENČNÍHO PROTEINU.....	46

4.3.1.	<i>Expres proteinu R03E1.2 v embryu C. elegans</i>	47
4.3.2.	<i>Expres proteinu R03E1.2 v larvách C. elegans</i>	48
4.3.3.	<i>Expres proteinu R03E1.2 v dospělých C. elegans</i>	51
4.4.	STUDIUM FUNKCE GENU R03E1.2 POST TRANSLAČNÍM UMLČOVÁNÍM GENOVÉ EXPRESE METODOU RNA INTERFERENCE	52
4.4.1.	<i>RNA interference prováděná kultivací populace C. elegans na bakteriální kultuře produkující dvouvláknovou RNA</i>	52
4.4.2.	<i>Příprava dvouvláknové RNA použité pro inhibici genu R03E1.2</i>	54
4.4.3.	<i>RNA interference prováděná injikováním dvouvláknové RNA inhibující gen R03E1.2 do C. elegans</i>	55
4.4.3.1.	<i>Změny fenotypu larev C. elegans vyvolané vlivem RNA interference inhibující gen R03E1.2</i>	56
4.4.4.	<i>RNA interference prováděná injikováním dvouvláknové RNA inhibující gen R03E1.2 do linie C. elegans 7272</i>	58
4.4.5.	<i>Stanovení změny exprese „Wnt cílových genů“ metodou kvantitativní PCR v populaci C. elegans vystavené RNA interferenci genu R03E1.2</i>	60
5.	DISKUSE	64
6.	ZÁVĚR	69
7.	POUŽITÁ LITERATURA	71

1. Úvod

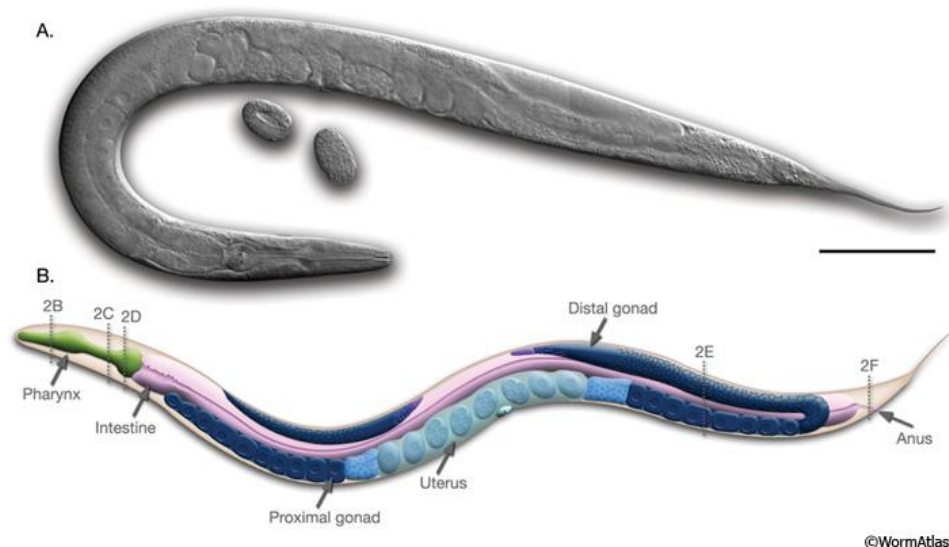
1.1. Modelový organismus *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (hád'átka obecné) je asi 1 mm dlouhý nepatogenní živočich z kmene hlístic (nematod), jenž je ve volné přírodě rozšířen takřka po celém světě. Intenzivní studium hád'átka bylo zahájeno v 70. letech minulého století výzkumnou skupinou Sydney Brennera a od té doby se uplatnilo jako modelový organismus využívaný zejména pro výzkum molekulárně biologických mechanismů, genetiky, neurologie a stárnutí (1).

Mezi hlavní přednosti hád'átka jakožto modelového organismu patří především jeho krátký životní cyklus, který při laboratorní teplotě trvá přibližně 72 hodin, nenáročná kultivace, přítomnost relativně rozvinutého nervového systému (302 neuronů představuje u hád'átka třetinu všech somatických buněk) a v neposlední řadě také detailní znalost vývojové linie všech jeho buněk. Hád'átka je navíc během celého svého vývoje průsvitné, což umožňuje nejen sledování vývoje jednotlivých tkání v reálném čase, ale i jejich označení pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, z angl. „green fluorescent protein“). Fúzní proteiny obsahující sekvenci pro GFP bývají dále využívány pro studium konkrétního genu, kdy je možné sledovat v jaké tkáni a v jakém vývojovém stádiu je daný gen exprimován a to bez nutnosti přidání exogenních substrátů nebo kofaktorů (2).

1.1.1. Anatomie *C. elegans*

Fotografie a anatomické znázornění těla dospělého hermafrodita *C. elegans* je uvedeno na obr. 1. Podobně jako ostatní hlístice má i *C. elegans* nečláňkované tělo, rozdělené na vnější a vnitřní tubus. Vnější část se skládá z kutikuly tvořené kolagenem, hypodermis, exkrecečního a nervového systému a svalů. Vnitřní část je tvořena hltanem, střevem a gonádou. Všechny tyto tkáně jsou udržovány pod stálým hydrostatickým tlakem pomocí osmoregulačního systému (3).

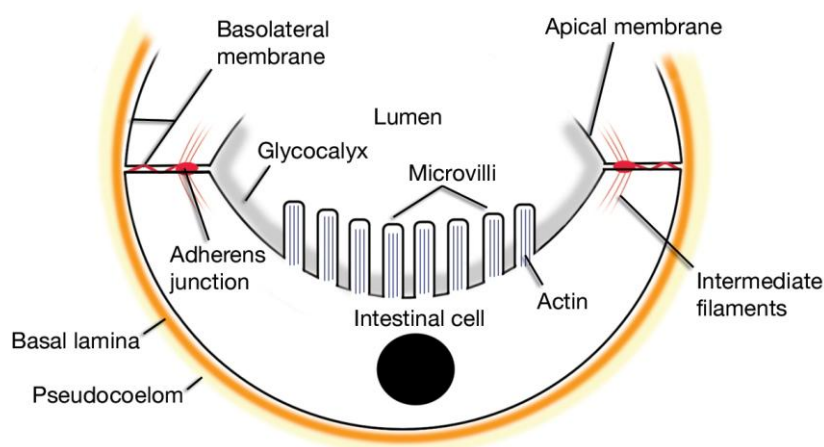


Obr. 1: **Anatomie dospělého hermafrodita *C. elegans*** A. Fotografie dospělého hermafrodita, měřítko 0,1 mm; B. Schematické znázornění anatomických struktur. Měřítko je 0,1 mm. Převzato z (1).

Exkreční systém tvoří v organismu *C. elegans* čtyři buňky a jeho funkce je analogická k renálnímu systému vyšších živočichů, kdy se jedná o osmotickou regulaci, vylučování odpadních látek, ale i syntézu a sekreci hormonů (4).

Nervový systém *C. elegans* se dělí na dva nezávislé systémy: velký somatický (282 neuronů) a malý hltanový (20 neuronů), přičemž oba tyto systémy spolu komunikují prostřednictvím páru interneuronů (3).

Hád'átka přijímá potravu hltanem, který je v podstatě autonomním orgánem s vlastním nervovým systémem, svalstvem a epitelem. V hltanu je potrava rozdrčena a následně pumpována dále do střeva. Střevo je u *C. elegans* tvořeno dvaceti buňkami, které jsou všechny odvozeny od jediné zárodečné buněčné linie. Enterocyty jsou velké buňky s výraznými jádrem, velkým počtem mitochondrií, ribosomů, rozsáhlým drsným endoplazmatickým retikulem a množstvím zásobních granulí, jejichž tvar a velikost se během vývoje organismu zásadním způsobem mění (3). Primární funkcí enterocytů je sekrece trávicích enzymů, vstřebávání živin a jejich metabolismus. Kromě toho však slouží jako úložiště zásobních látek, podílí se na tvorbě oocytů, metabolismu mastných kyselin a dalších procesech, které jsou u vyšších živočichů vesměs prováděny jinými než střevními buňkami (5). Na obr. 2 je uveden příčný řez střevní buňkou *C. elegans*.



Obr. 2: **Příčný řez střešní buňkou *C. elegans*.** Z apikálního povrchu enterocytů vyrůstají mikrovilli, které tvoří kartáčovitý povrch. Proti toxinům je chráněna vrstva glykoproteinů (glycocalyx), která zároveň slouží jako filtr a nosič trávicích enzymů. Převzato z (5).

Zhruba 0,1 % populace *C. elegans* představují samci, jejichž anatomie se od anatomie hermafroditů poměrně liší. S výjimkou hltanu a exkrečního systému vykazují téměř všechny tkáně nějakou míru pohlavního dimorfismu. Tělo samce má také více buněk (1031), než tělo hermafrodita (956). Je tomu tak proto, že nervový systém samce obsahuje navíc ještě 89 neuronů, jejichž převážná většina se podílí na pohlavním rozmnožování hád'átek (3).

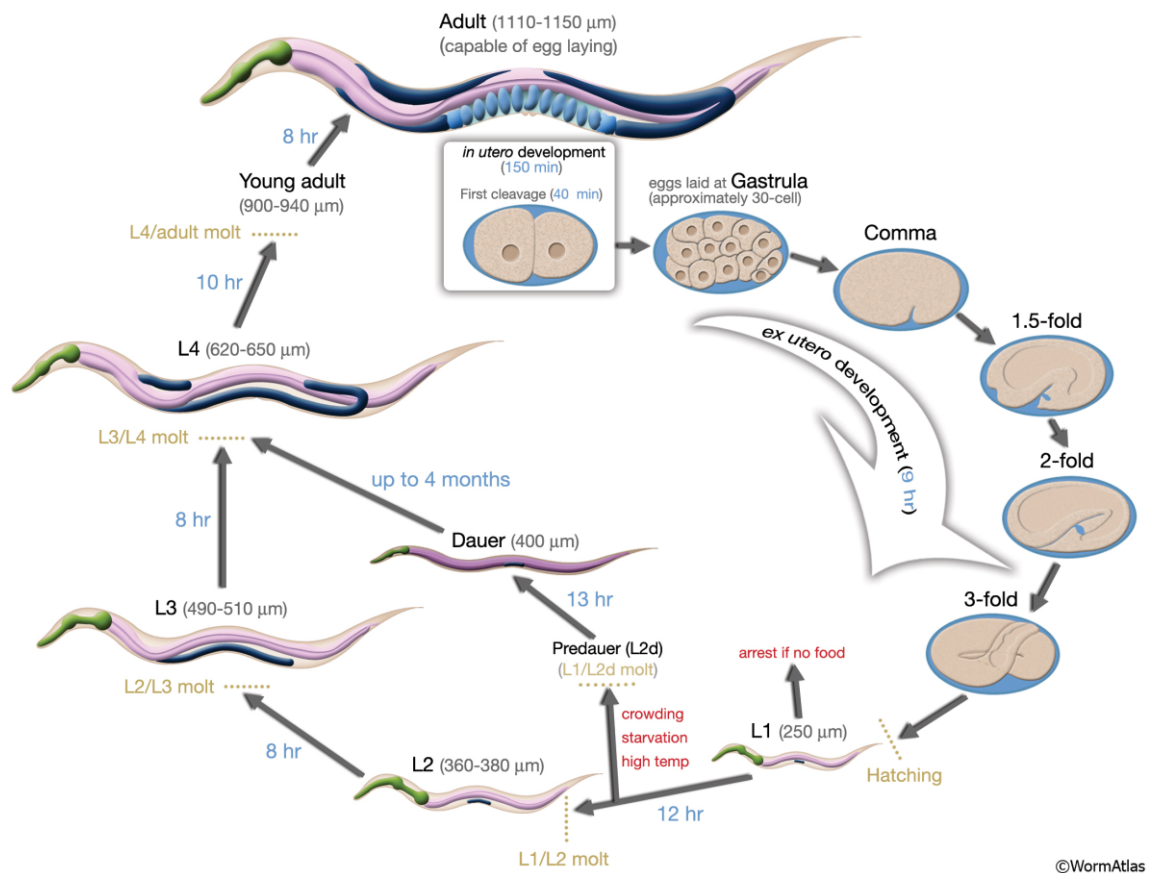
1.1.2. Životní cyklus *C. elegans*

Životní cyklus *C. elegans* je rozdělen na embryogenezi, čtyři larvální stádia (L1 až L4) a dospělost. Embryogeneze se skládá z proliferace a organogeneze/morfogeneze. Během proliferace dochází k rozdělení oplodněné gamety na zhruba 550 nediferenciovaných buněk. První fáze proliferace probíhá v děloze matky do doby, než je embryo rozděleno na přibližně 30 buněk. Na konci této fáze (při teplotě 22 °C trvající 300 až 350 min) již jsou rozeznatelné tři zárodečné listy: ektoderm, ze kterého vzniká hypodermis a nervový systém; mesoderm, jenž je základem hltanu a svalstva a endoderm, z něhož vzniká trávicí a rozmnožovací systém (6). Během morfogeneze již nedochází k přílišnému dělení buněk, ale k jejich diferenciaci a vzniku jednotlivých tkání. Nový jedinec se líhne s 558 somatickými buňkami po uplynutí přibližně 800 minut od doby fertilizace (7).

Za zahájení postembryonálního vývoje je pokládán okamžik, kdy hád'átko začíná přijímat potravu. Za normálních podmínek prochází jedinec čtyřmi larválními stádii, během nichž dochází k buněčným dělením probíhajícím podle téměř neměnného vzoru, na jehož konci vzniká přesný počet diferenciovaných buněk s jednoznačně definovaným osudem. Konec každého larválního stádia je provázen svlékáním extracelulární kutikuly a syntézou nové. Během tohoto procesu se zpomaluje pohyb jícnu a jedinec prochází krátkým obdobím „letargu“ (3).

Při nedostatku potravy, vysoké populační hustotě, nebo nepříznivých tepelných podmínkách je larva schopna vstoupit do stádia označovaného jako „dauer“, ve kterém nepřijímá potravu a dochází u ní k útlumu fyziologických funkcí. Ve stavu fakultativní diapauzy je larva schopna přežít až po dobu 4 měsíců a v případě obnovení optimálních životních podmínek se plně navrátit do reprodukčního cyklu během přibližně 12 hod (8).

Při teplotě okolo 24 °C dosahuje *C. elegans* dospělosti a začíná klást vajíčka v době 45 až 50 hodin po vylíhnutí, čímž završuje svůj třídní reprodukční cyklus (9), znázorněný na obr. 3. Produkce oocytů a jejich autofertilizace trvá u dospělého hermafrodita po dobu 3 až 4 dnů, hád'átko však následně žije ještě 10 až 15 dní. Za běžných podmínek vyprodukuje jeden hermafrodit až 300 potomků z důvodu limitovaného množství spermií umožňujících autofertilizaci. V případě oplodnění samcem však počet potomků jedné matky může vzrůst až na 1400 (10).



Obr. 3: Životní cyklus nematoda *C. elegans* při teplotě 22 °C. Převzato z (1)

1.1.3. Post-translační umlčování genové exprese (RNA-interference)

Důležitou technikou umožňující (nejen) u háďátka studium funkce genu *in vivo* je RNA-interference (RNAi), neboli post-translační umlčování genové exprese. RNAi je evolučně vysoce konzervovaný mechanismus sloužící k regulaci genové exprese, ale také jako obrana před patogenem.

RNAi je založena na sekvenční komplementaritě endogenní RNA a specifické, přibližně 20 párů bází (pb) dlouhé RNA, označované jako malá interferující RNA (siRNA, z angl. „small interfering RNA“). V procesu RNAi je cílová RNA nejprve rozštěpena endonukleasou „Dicer“ (enzym z rodiny RNas III) na úseky dlouhé 21 až 24 pb, které jsou následně jakožto siRNA zabudovány do „umlčovacího komplexu“ (RISC, z angl. „RNA-induced silencing complex“). RISC je multienzymový komplex obsahující mimo jiné endonukleasu „argonaut“, která štěpí cílovou endogenní mRNA, identifikovanou na základě její komplementarity se siRNA vázanou v RISC. Takto dochází jednak ke

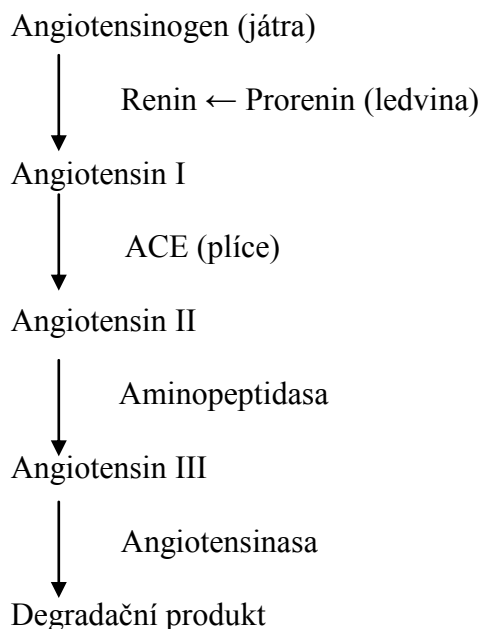
znemožnění translace cílové mRNA do proteinu a jednak k amplifikaci signálu pro umlčení daného genu, protože z degradované mRNA vznikají další siRNA (11), (12).

1.2. Renin-angiotensinový systém u člověka

1.2.1. Komponenty a funkce renin-angiotensinového systému

Renin-angiotensinový systém (RAS) je neurohormonální regulační mechanismus, jehož funkcí je udržovat stabilní fyziologickou koncentraci elektrolytů v krvi. Poruchy tohoto systému vedou zpravidla k hypertenzi, srdeční hypertrofii, ale také zánětům a vývojovým poruchám (13). Základní schéma RAS je uvedeno na obr. 4.

Za jedinou biologicky aktivní molekulu celé kaskády byl dlouhou dobu považován pouze angiotensin II. Angiotensin zvyšuje krevní tlak jednak tím, že vyvolává vasokonstrikci arteriol, ale také stimuluje uvolňování hormonu aldosteronu z adrenálního kortexu. Místem působení aldosteronu je ledvina, ve které jeho vlivem dochází ke zvýšení resorpce vody a sodných iontů, což v důsledku opět vede ke zvýšení krevního tlaku (13).



Obr. 4: **Základní schéma renin-angiotensinového systému.** Převzato a upraveno z (13), (14).

Angiotensin II je produkován ve formě preprohormonu označovaného jako angiotensinogen. Angiotensinogen je α -globulin konstitutivně exprimovaný a uvolňovaný játry, jehož koncentrace v plasmě však může být zvýšena pomocí kortikosteroidů, estrogener, thyroideů a angiotensinu II. Přeměna angiotensinogenu na angiotensin II probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku dochází pomocí reninu k proteolýze angiotensinogenu za vzniku biologicky neaktivního dekaeptidu angiotensinu I. Ten je následně přeměněn v plicích na angiotensin II odštěpením dvou C-terminálních aminokyselinových reziduí pomocí angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE, z angl. „Angiotensin-converting enzyme“) (13), (14).

Renin hraje v této kaskádě zásadní roli, protože rychlost přeměny angiotensinogenu na angiotensin I limituje rychlost celé kaskády. Jelikož je angiotensinogen v krvi přítomen v koncentraci, která odpovídá jeho K_m pro interakci s reninem, umožňují i malé změny v jeho koncentraci výrazně regulovat rychlost tvorby angiotensinu II (13).

Samotný renin je aspartátová proteasa sekretovaná ledvinami ve formě proenzymu. Prorenin na svém N-konci nese oproti aktivní formě prosegment o délce 43 aminokyselin (15). Plasmatická koncentrace proreninu je 10x až 100x vyšší než koncentrace reninu a kromě proteolytické aktivace, probíhající výlučně v juxtaglomerulárních buňkách ledvin, může být renin aktivován též vazbou na specifický proreninový receptor (16), (17).

Kromě extracelulárního proreninového receptoru (PRR), je znám ještě intracelulární renin-vážeč protein (RnBp, z angl. „Renin-binding protein“) a také mannos-6-fosfátový receptor (M6P-R). RnBp váže pouze renin, u nějž následně dochází k inhibici enzymové aktivity. Přesto se ale nezdá, že by se RnBp jakkoliv podílel na RAS, protože myši postrádající příslušný gen nejeví žádné abnormality v regulaci krevního tlaku (18). M6P-R nespecificky váže fosfomannosylované proteiny, v tomto případě tedy jak renin tak prorenin. Předpokládanou úlohou M6P-R je, že pro tyto dva proteiny funguje jako „clearance receptor“ a tudíž napomáhá regulovat jejich extracelulární koncentraci (19).

1.2.2. Proreninový receptor

Lidský proreninový receptor (PRR) je transmembránový protein skládající se z 350 aminokyselin s velkou, neglykosylovanou, vysoce hydrofobní N-terminální doménou a poměrně krátkým cytoplazmatickým C-koncem (20). Orthology tohoto proteinu jsou přítomny jak u obratlovců, tak bezobratlých, přičemž extracelulární doména má větší míru sekvenční identity pouze u obratlovců. Oproti tomu intracelulární doména vykazuje vysokou míru evoluční konzervovanosti napříč živočišnou říší. Tato skutečnost vedla ke vzniku hypotézy, že zatímco N-terminální doména, účastní se RAS díky své schopnosti vázat prorenin, by mohla být z hlediska evoluce relativní novinkou. C-terminální doména je evolučně daleko starší a účastní se procesu, který s RAS nijak nesouvisí (20). Srovnání aminokyselinových sekvencí PRR v myši, potkanovi, člověku, drápatce, octomilce a háďátku je uvedeno na obr. 5.

Extracelulární doména	
M.musculus	-MAVLVLLFFLVAGALGNEFSILRSPGSVVFRNGNWPPIGDRIIPDVAALSMGFSVKEDL 59
R.norvegicus	-MAVLVLLSSSLVSSALANEFSSILRSPGSVVFRNGNWPPIGDRIIPDVAALSMGFSVKEDL 59
H.sapiens	--MAVFVLLALVAGVLGNEFSILKSPGSVVFRNGNWPPIGERIPDVAALSMGFSVKEDL 58
X.laavis	---MLRLVLVALVVAVSSADFTVLKSPQYQIFQEGKWPVPGDRIPDVISLSMGFSVEEGL 57
D.melanogaster	MLRVFVIFSLFIAAINASGEFTVLNRPKAISFK-GNDALESHYVGDVLYASMGNAVSGDT 59
C.elegans	--MKFVLLVSALVAACAASSLEIIAAPASLKFPDADATLKTTLISTNLNENILGLSARQVD 58
	. : . : . : : * * . . : : : * :
M.musculus	SWPGLAVGNLFHRPRATIMVMVKGVDKLALPAGSVISYPLENAVPPSLDSVANSIHSLSFS 119
R.norvegicus	SWPGLAVGNLFHRPRATIMVTVKGVDKLALPTGSVISYPLENAVPPSLDSVANSIHSLSFS 119
H.sapiens	SWPGLAVGNLFHRPRATVMVMVGVNKLALPPGSVISYPLENAVPPSLDSVANSIHSLSFS 118
X.laavis	DWPGLVGNLFQRPRSTVLVTGTGNKLPLS-GNGMSYPVENAVPYSLDSVNSVSVFS 116
D.melanogaster	NWNGLTINDPFNLAKGVILVHVQIGHVTTAGNVKTYELTSGSGTDASLNALAAELEAANE 119
C.elegans	GFS--VSVMFSRPRALAVTVIGADNLNLGGKTYSTKSDG-----VENVGFDQDMALI 110
	. : : * . . : * * * . : : : . .
M.musculus	EETPVVLQLAPSEERVYVMVGKANSVFEDLSVTLRQLRNRLFQENSLNLSPLNSLSRNN 179
R.norvegicus	EETPVVLQLAPSEERVYVMVGKANSVFEDLSVTLRQLRNRLFQENSVLNSLPLNSLSRNN 179
H.sapiens	EETPVVLQLAPSEERVYVMVGKANSVFEDLSVTLRQLRNRLFQENSVLSSPLNSLSRNN 178
X.laavis	EEMPVVLQLAPIEERVYVMVGKANTVFEDLSVTLRQLRTRLEQDNSIIQSLPVSLSYKND 176
D.melanogaster	FVCDINFEQFDDG-----VQAWKSCFGDFEAPAAKPTKHLN----- 155
C.elegans	FGADRENVQVSAGGITGMLALAAQQAEDATVIKTKR----- 148
	: : : :
M.musculus	VDLLFLSELQVLHDISSLLSRHKHLAKDHSPDLYSLELAGLDELGKRYGEDSEQFRDASK 239
R.norvegicus	VDLLFLSELQVLHDISSLLSRHKHLAKDHSPDLYSLELAGLDELGKRYGEDSEQFRDASK 239
H.sapiens	VDLLFLSELQVLHDISSLLSRHKHLAKDHSPDLYSLELAGLDELGKRYGEDSEQFRDASK 238
X.laavis	TDRLFLSELQVLQDIITLLSGHKHLAKDNVPDIYSLELTGLEEIKKRYGEESAKFKDAVK 236
D.melanogaster	-PSLHTADKQFLQEVGFINSAADHLAEMAKPSNVMLRVSVSDGVAKAHGEKSVAVEEANK 214
C.elegans	-----STLVKELEAVYQLAAAIKSAGVQMDNNADVFRVSITGLVGITESAQKEEAVA 200
	. : : : : . : . : . : . * . : *
M.musculus	ILVDALQKFADDMYSLYGGNAVVELVTVKSFDTSLVRKS-----RTILEAKQE 287
R.norvegicus	ILVDALQKFADDMYSLYGGNAVVELVTVKSFDTSLVRKS-----RTILETKQE 287
H.sapiens	ILVDALQKFADDMYSLYGGNAVVELVTVKSFDTSLIRKT-----RTILEAKQA 286
X.laavis	ILSDFLQKFADDMYSIYGGNAIVEVVAVESFEIPLVRRS-----RSILASEAI 284
D.melanogaster	LLSAAISRLLAASQKSSDS---VLFVQTTEKDVAASRAK-----RDTIAASTT 259
C.elegans	DVKAAIEALTASINNAYGGQAVIELLAFEAESGAEEKSTESREIPNHNQKRDTSKSTPT 260
	: : . : . . : : : *
Intracelulární doména	
M.musculus	N-TQSPYNLAYKYNLEYSVFNVLVIMIGLALAVIITSYNIWNMDPGYDSIIYRMTNQK 346
R.norvegicus	N-TQSPYNLAYKYNLEYSVFNVLVIMIGLALAVIITSYNIWNMDPGYDSIIYRMTNQK 346
H.sapiens	KNPASPYNLAYKYNFEYSVFNVLVIMIALALAVIITSYNIWNMDPGYDSIIYRMTNQK 346
X.laavis	SNPGSPYNLAYQYNFDYAVIFNIILWIMIGLALAVIAISYSLWNMDPGYDSIIYRMTNQK 344
D.melanogaster	N----PYNLAVYGYSDYFVIFNIILWFMVVFGLSLLAICYAIAAMDPGRDSIIYRMTSTR 315
C.elegans	QLARENLQVTVPVSSDYPAIFAIFLGLVILVVALIYIVVGMAIDPEKDSIIYRMTTTR 320
	. : : : . : * . : * : : : : : : : : * * * * * . :
M.musculus	IRID- 350
R.norvegicus	IRMD- 350
H.sapiens	IRMD- 350
X.laavis	IRMD- 348
D.melanogaster	IKKDN- 320
C.elegans	MKKD- 324
	: : *

Obr. 5: Srovnání aminokyselinových sekvencí PRR v myši (*M. musculus*), potkanovi (*R. norvegicus*), člověku (*H. sapiens*), drápatce (*X. laevis*), octomilce (*D. melanogaster*) a háďátku (*C. elegans*). Sekvence byly porovnány pomocí programu ClustalW2 (21), (22). * jsou označeny aminokyseliny identické, : konzervované a . semikonzervované. Zvýrazněn je začátek extracelulární N-terminální domény, jež u vyšších obratlovců váže (pro)renin a evolučně zachovalejší intracelulární C-terminální doména.

Existence specifického PRR byla poprvé prokázána transfekováním cDNA kódující do té doby neznámý transmembránový protein do lidských mesangiálních buněk, u nichž bylo známo, že neexprimují žádný protein schopný vázat (pro)renin. U těchto buněk následně došlo až ke čtyřnásobnému zvýšení efektivity přeměny angiotensinogenu na angiotensin I. Zároveň bylo prokázáno, že tento receptor specificky váže prorenin, čímž zvyšuje jeho katalytickou aktivitu bez nutnosti proteolýzy (17). Navázáním proreninu na jeho receptor totiž dochází ke konformační změně, která odhaluje aktivní centrum reninu (23).

Za jedinou funkci (pro)reninu v savčím organismu byla dlouho považována pouze jeho role v RAS. Tento protein se však prostřednictvím svého receptoru podílí také na buněčné signalizaci. Po navázání proreninu na PRR dochází kromě zvýšení katalytické aktivity pro přeměnu angiotensinogenu na angiotensin I také k fosforylaci PRR a následně k aktivaci dvou „kinas regulovaných extracelulárním signálem“ (ERK, z angl. „extracellular-signal-regulated kinase“) ERK 1 a ERK 2, patřících mezi „mitogen-aktivované protein-kinasy“ (MAPK) (17). U lidských mesangiálních buněk vede RNAi PRR k blokaci aktivace ERK 1 a 2 vyvolané (pro)reninem, což svědčí o jeho nezbytnosti pro mediaci reninového signálu v tomto procesu (24). MAPK hrají zásadní úlohu při přenosu extracelulárního signálu spojeného s fosforylací cílových proteinů, který vede k řadě intracelulárních odpovědí, zejména pak ke stimulaci buněčného růstu a diferenciaci (25).

Přestože blokaci RAS je možné zpomalit rozvoj diabetické nefropatie, v konečném stádiu této poruchy nemá blokace RAS již žádný význam. U myší trpících diabetem se poměr proreninu a aktivního reninu významně zvyšuje, což vede rozvoji nefropatie nezávislé na aktivovaném reninu, potažmo ani angiotensinu II. Z práce prováděné na diabetických myších tedy mimo jiné vyplynulo, že za určitých podmínek vede aktivace proreninového receptoru k nefropatii vyvolané pouze působením MAPK a nikoliv komponentami RAS (26). Z tohoto důvodu jsou pro léčbu poškození koncových orgánů při diabetu a hypertenzi uvažovány inhibitory PRR jako potencionálně účinnější než konvenční inhibitory RAS (27).

1.3. Buněčná signalizace „Wnt“

Signální kaskáda Wnt je evolučně konzervovaným mechanismem zprostředkujícím mezibuněčnou komunikaci při vývoji živočišného organismu, který se podílí na řadě procesů jako je proliferace, diferenciace nebo buněčná migrace. Tato dráha je aktivována vazbou Wnt ligandu na extracelulární receptor, čímž dochází k sérii intracelulárních odpovědí, na jejichž konci je změna transkripčního programu cílových buněk. Je tomu tak proto, že pomocí Wnt-kaskády jsou regulovány transkripční faktory nebo jiné signální molekuly ovlivňující úroveň transkripce dalších genů. Wnt signální dráhy se účastní více než 50 různých proteinů a podle efektoru, který využívá, se dále dělí na kanonickou a nekanonickou větev (28), (29).

Wnt signalizace je intenzivně studována na modelových systémech jako jsou lidské tkáňové kultury, *C. elegans*, *D. melanogaster* (octomilka obecná) nebo embryo rodu *Xenopus* (drápatka), u kterých bylo prokázáno, že narušení této kaskády vede k řadě vývojových defektů (29). Samotný název Wnt je odvozen z názvů genů *Wg* a *Int-1*. Proteinový produkt genu *Wg* je první popsáný ligand účastnící se Wnt signalizace a jeho mutace vede u octomilky k bezkřídlému fenotypu (30). *Int-1* je myším homologem *Wg*, který byl již v 80. letech 20. století identifikován jako preferovaný úsek genomu, do kterého se integruje myší onkovirus vyvolávající karcinom mléčných žláz (31), (32).

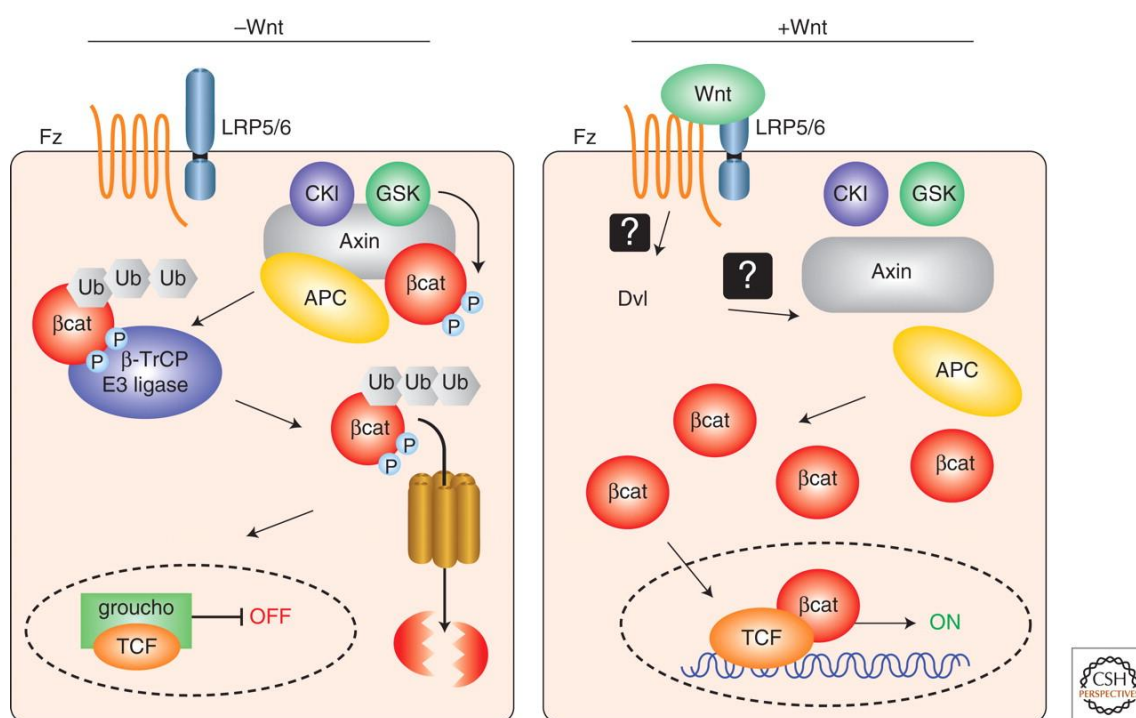
Poznatky o této signální dráze jsou významné i pro porozumění (pato)biochemii lidského organismu, jelikož abnormální Wnt dráha bývá u lidí často spojena s výskytem kolorektálního karcinomu (33). Mezi Wnt-cílové geny spojené s tímto typem rakoviny patří *c-myc*, *cyklin D1* a *tcf-1* (34), (35), (36).

1.3.1. Buněčná signalizace „Wnt“ v obratlovcích a hmyzu

Hlavním efektozem kanonické Wnt dráhy je cytoplazmatický β -katenin, který funguje jako transkripční faktor, jehož stabilita je regulována pomocí destrukčního komplexu APC (z angl. „adenomatous polyposis coli“)/Axin. β -Katenin interaguje v nepřítomnosti Wnt ligandu s tumor supresorovými proteiny APC/Axin a takto se stává substrátem pro kaseinovou kinasu 1 (CK-1, z angl. „casein-kinase 1“) a kinasu glykogensynthasy (GSK, z

angl. „glycogen synthase kinase“). Fosforylovaný β -katenin je následně ubiquitinován a rozštěpen proteazomem (37). V nepřítomnosti β -kateninu zůstávají jaderné transkripční faktory TCF (z angl. „T-cell factor“) a LEF (z angl. „lymphoid enhancer factor“) navázány na promotorových oblastech Wnt-cílových genů, což vede k represi jejich transkripce (38), (39).

Při navázání Wnt ligandu na jeho receptor (u člověka označovaný jako „Frizzled“), dochází ke vzniku ternárního komplexu mezi ligandem, receptorem a koreceptorem LRP-6 (z angl. „Low-density lipoprotein receptor-related protein 6“) (40). Intracelulární doména LRP-6 je následně fosforylována pomocí kinas CK1 a GSK3 β , což v důsledku vede k disociaci komplexu APC/Axin a tudíž ke stabilizaci β -kateninu, který putuje do jádra, kde se váže na transkripční faktory TCF a LEF (37), (41). β -Katenin tímto způsobem uvolňuje TCF/LEF z vazby na DNA a tím odkrývá doménu pro aktivaci transkripce (38). Za připomínku stojí skutečnost, že kinasy CK1 a GSK3 β hrají v kanonické Wnt kaskádě poněkud paradoxní úlohu, protože na úrovni LRP-6 se chovají jako agonisté, kdežto na úrovni degradačního komplexu APC/Axin jako antagonisté Wnt ligandu (37). Zjednodušené schéma kanonické Wnt signalizace v lidském organismu je uvedeno na obr. 6.



Obr. 6: Zjednodušené schéma kanonické Wnt signalizace v lidském organismu. Převzato z (42).

Průběh nekanonické Wnt kaskády je prozkoumán v daleko menší míře, než průběh kaskády kanonické, je však prokázáno, že nekanonická dráha přenáší signál nezávisle na β -kateninu. U obratlovců je označována jako Wnt/ Ca^{2+} dráha a ovlivňuje gastrulaci, zatímco u *D. melanogaster* byla pojmenována Wnt/PCP (planar cell polarity) a určuje vývoj chloupků a ommatidií (43). U nekanonické Wnt/ Ca^{2+} dráhy fungují jako 2. posel vápenaté ionty, jejichž uvolnění je spuštěno navázáním Wnt ligandu na jeho extracelulární receptor. Ca^{2+} následně aktivuje efektorové proteiny. Ligand pro Wnt/PCP dráhu u *Drosophila* zatím není znám, avšak i zde jsou využívány stejné receptory jako v případě kanonické dráhy. Signál je poté přenášen na G-proteiny a jako 2. posel v tomto případě působí cyklické AMP (44).

1.3.2. Buněčná signalizace „Wnt“ v *C. elegans*

Genom *C. elegans* kóduje řadu proteinů, jejichž homology se účastní jak kanonické, tak nekanonické Wnt signální dráhy u obratlovců i octomilek (45). V některých ohledech se však Wnt signalizace *C. elegans* od této dráhy u ostatních organismů odlišuje. Jedním z nejzásadnějších rozdílů je fakt, že genom *C. elegans* kóduje celkem tři různé homology β -kateninu (46). Další důležitou odlišností je opačné působení homologů APC, GSK3 β a transkripčního faktoru TCF, ve srovnání s působením těchto proteinů u obratlovců a octomilek (47).

1.3.2.1. Kanonická signalizace „Wnt“ v *C. elegans*

Kanonická Wnt kaskáda bývá u *C. elegans* označována také jako Wnt/BAR-1, protože využívá homolog β -kateninu s názvem BAR-1 (z angl. „beta-catenin/armadillo related“) (28).

Jedním z procesů řízených v organismu *C. elegans* pomocí kanonické signalizace Wnt je migrace dvou neuroblastů nacházejících se podél anterior/posteriorní osy těla, označovaných jako QL a QR. Migraci obou těchto neuroblastů ovlivňuje transkripční faktor MAB-5 (z angl. „male abnormal“) jehož vlastní exprese je řízena pomocí Wnt kaskády. Zatímco potomci buňky QL, jenž exprimuje gen *mab-5*, migrují dále v

posteriorním směru, potomci QR gen *mab-5* neexprimují a jejich migrace probíhá ve směru anteriorním (48). Zajímavé je, že faktorem rozhodujícím u potomků buněk QL a QR o expresi *mab-5* je jejich rozdílná senzitivita k Wnt ligandu, protože obě buňky jsou vystaveny stejné koncentraci Wnt ligandu (49).

Dalším vývojovým procesem, který u *C. elegans* využívá kanonickou Wnt kaskádu je diferenciace šestice tzv. prekursorů vulválních buněk (VPC, z angl. „vulval precursor cells“). V závislosti na vnějším signálu tyto buňky adoptují jeden ze tří možných osudů, přičemž rozhodnutí, o který z nich se jedná, je řízeno expresí genu *lin-39* (50). Důsledkem narušení dráhy regulující míru exprese *lin-39* je diferenciace VPC podle jiného, než „standardního“ vzoru, což vede k vývoji defektní vulvy (51).

Geny *lin-39* a *mab-5* patří do rodiny genů, které kódují transkripční faktory obsahující tzv. „homeobox doménu“. Proteiny s touto doménou jsou známé jako důležité regulátory vývojových procesů u mnoha živočišných druhů.

1.3.2.2. Nekanonická signalizace „Wnt“ v *C. elegans*

Na rozdíl od jiných živočichů je v organismu *C. elegans* β -katenin využíván i v případě nekanonické Wnt kaskády. Od kanonické ji však odlišuje rozdílné chování některých jejích komponentů a fakt, že využívá jiný β -kateninový homolog, v případě nekanonické kaskády označovaný jako WRM-1 (z angl. „worm armadillo“). Regulátory transkripce POP-1 (z angl. „posterior pharynx defect“) a TCF fungují i zde jako represory, vážící se v nepřítomnosti Wnt ligandu k promotorovým oblastem cílových genů. Vazba ligandu však nevyvolává zvýšení transkripce, ale naopak uvolnění dalších molekul POP-1 a TCF, což transkripci cílového genu namísto její aktivace ještě více inhibuje (28).

Při jednom z procesů využívajících nekanonickou dráhu Wnt dochází k přenosu signálu mezi embryonálními buňkami ve fázi, kdy je embryo tvořeno pouze čtyřmi buňkami označovanými jako ABa, ABp, P2 a EMS. Signál generovaný buňkou P2 polarizuje EMS, která se následně dělí na buňky MS (mesoderm) a E (endoderm), z nichž následně vzniká mezoderm a endoderm (52).

V nepřítomnosti Wnt ligandu dochází pomocí transkripčních faktorů POP-1 a TCF k inhibici cílových genů specifických převážně pro endoderm (*end-1* a *end-3*) (53). Koncentrace těchto dvou faktorů je v jádře buňky E výrazně nižší, než v jádře buňky MS (54). Zajímavou skutečností je fakt, že mutace většiny genů účastníků se této kaskády vede k fenotypu, kdy z EMS vznikají dvě MS buňky (Mom fenotyp), zatímco pouze mutace genu *pop-1* vyvolává fenotyp opačný, kdy vznikají dvě E buňky (55).

1.4. Studium proreninového receptoru v modelových systémech

Vzhledem k nepřítomnosti RAS v některých organismech, jejichž genom kóduje homolog PRR, bylo předpokládáno, že se proteinový produkt tohoto genu účastní i procesu, který je na RAS nezávislý. Z prací prováděných na lidských tkáňových kulturách, octomilkách a embryích drápatky vyplývá, že u těchto modelových systémů dochází vlivem RNAi PRR k inhibici exprese Wnt-řízených reportérových genů. Navíc bylo ukázáno, že PRR na proteinové úrovni interaguje s některými komponentami Wnt kaskády, takže lze důvodně předpokládat, že PRR se nějakým způsobem účastní právě této signální dráhy (56), (57).

1.4.1. Proreninový receptor se účastní buněčné signalizace „Wnt“

Následkem inhibice exprese PRR *in vivo* dochází u *Drosophily* k poruchám při vývoji křídel, což je fenotyp typicky pozorovaný při ztrátě funkce některé komponenty Wnt kaskády (57). Evoluční zachovalost role PRR ve Wnt signalizaci dokazuje dále schopnost lidské RNA kódující PRR zvrátit vývojové defekty až u 70 % octomilek podrobených RNAi tohoto genu (57).

U lidských ledvinných buněk HEK293T dochází vlivem RNAi PRR k inhibici Wnt signálu stimulovaného pomocí ligandů Wnt3a a Wnt1, nikoliv však signálu indukovaného transmembránovými (Dvl a LRP6) a intracelulárními (β -katenin) komponentami Wnt dráhy, z čehož se dá soudit, že PRR se Wnt signalizace účastní na nebo za úrovni membránového receptoru LRP-6 (56). V koimunoprecipitačním experimentu bylo dále

prokázáno, že PRR (konkrétně jeho extracelulární doména) interaguje s Wnt-receptory LRP6 a Fz8, což je ve shodě s výsledky RNAi i se skutečností, že PRR je transmembránový protein (56).

1.4.2. Proreninový receptor je kofaktorem vakuolární H^+ -ATPasy

PRR byl identifikován jako kofaktor vážící se na vakuolární H^+ -ATPasu (V-ATPasa) ještě před objevením schopnosti tohoto proteinu vázat prorenin (58). V-ATPasa je multiproteinový komplex lokalizovaný ve vnitrobuněčných organelách a plasmatické membráně, který se podílí na udržování stabilního vnitrobuněčného pH a řadě dalších procesů včetně endocytózy (59). Schopnost PRR vázat se na V-ATPasu byla potvrzena ve více nezávislých experimentech, kdy bylo zároveň ukázáno, že tato interakce je zprostředkována pomocí intracelulární a transmembránové části PRR (56). Vzhledem k tomu, že fosforylaci LRP-6 po navázání Wnt ligandu předchází jeho internalizace, V-ATPasa může hrát roli v endocytóze a fosforylaci LRP-6 a tudíž i stabilizaci β -kateninu. Předpokládá se, že PRR by pak fungoval jako specifický adaptor mezi LRP-6 a V-ATPasou (56).

1.4.3. V organismu *C. elegans* je exprese homologu proreninového receptoru řízena pomocí jaderného receptoru NHR-31

Jaderné hormonální receptory (NHR, z angl. „nuclear hormon receptor“) představují velkou skupinu transkripčních faktorů s konzervovanou DNA-vazebnou doménou a doménou vážající ligand, které umožňují regulaci transkripce pomocí autokrinních, endokrinních nebo parakrinních signálních molekul (hormonů) (60). V porovnání s ostatními organismy kóduje genom *C. elegans* výrazně vyšší množství NHR. Z celkových 284 genů pro jaderné receptory u *C. elegans* jich však bylo nalezeno pouze 15, jenž mají orthology i u jiných živočichů (61). Tato skutečnost bývá vysvětlována intenzivní duplikací a diverzifikací jednoho společného předka, evolučně příbuzného savčímu jadernému receptoru HNF4 (z angl. „hepatocyte nuclear factor 4“) (62). V *C. elegans* hrají NHR důležitou roli zejména během embryonálního a larválního vývoje (63), (64), (65). Mezi geny regulované pomocí NHR patří také některé geny kódující tzv.

„hedgehog“ proteiny, které podobně jako „Wnt“ proteiny zprostředkují buněčnou signalizaci během vývoje organismu (66).

Pomocí jaderného receptoru NHR-31 je v organismu *C. elegans* řízena i exprese homologu proreninového receptoru (genu *R03E1.2*). V důsledku inhibice NHR-31 vlivem RNAi dochází k významnému snížení hladiny mRNA genu *R03E1.2*, spolu s ním však ještě dalších 15 genů kódujících podjednotky V-ATPasy (60). S využitím RNAi a fúzního zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) bylo dále zjištěno, že funkcí NHR-31 je kontrola růstu a funkce exkrečního kanálu, ve kterém je tento gen majoritně exprimován a také, že je tento protein esenciální pro překonání osmotického stresu (60). Tyto výsledky podporují představu o funkci PRR v součinnosti s V-ATPasou a navíc otevírají možnost působení Wnt signalizace během vývoje exkrečního systému.

2. Cíl práce

Cíl této diplomové práce zabývající se studiem homologu lidského proreninového receptoru v modelovém organismu *C. elegans* (gen nesoucí označení *R03E1.2*) lze rozdělit na následující dílčí okruhy:

1. Porovnání míry exprese *R03E1.2* během vývoje *C. elegans* metodou kvantitativní PCR (qPCR).
2. Určení tkáně a vývojového stádia, ve kterém je gen *R03E1.2* exprimován. K tomuto účelu jsou využity linie *C. elegans* exprimující protein R03E1.2 označený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP)
3. Studium funkce *R03E1.2 in vivo* jeho inhibicí na úrovni mRNA metodou RNA-interference (RNAi). RNAi je navozena buď injikováním dvouvláknové RNA (dsRNA) připravené *in vitro* přímo do gonád dospělých hermafroditů *C. elegans* nebo kultivací *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dsRNA.
4. Vyhodnocení RNAi statistickým zpracováním vývojových defektů, mikroskopií a sledováním změny exprese vybraných Wnt-cílových genů metodou qPCR.

3. Materiál a Metody

3.1. Materiál

3.1.1. Biologický materiál

3.1.1.1. Linie *C. elegans*

N2

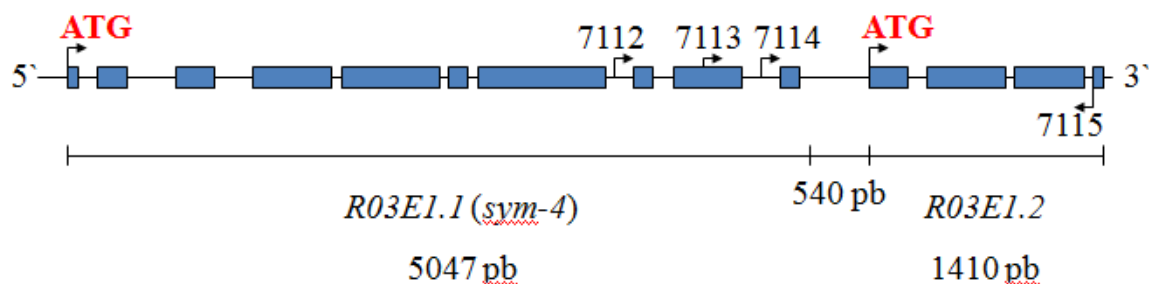
„Divoké“ háďátko (Bristolská varieta)

7270, 7271 a 7272

Linie *C. elegans* exprimující protein R03E1.2 označený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Linie byly připraveny kolegou MUDr. Tomášem Dvořákem vložением sekvence genu *R03E1.2* spolu se třemi různě dlouhými promotorovými úseky tohoto genu do vektoru pPD95.75. Vektor pPD95.75 je bezpromotorový GFP vektor neobsahující jaderný lokalizační signál navržený pro expresní studie *in vivo*. Vektor pPD95.75 věnoval Dr. Andrew Fire (Stanford University School of Medicine, Stanford CA, USA). Primery použité k přípravě konstruktů 7270, 7271 a 7272 jsou uvedeny v tab. 1, jejich pozice v rámci kosmidu *R03E1* je znázorněna na obr. 7. Takto připravené konstrukty byly injikovány do gonád dospělých N2. Potomstvo exprimující GFP bylo vyhledáno s využitím mikroskopu Olympus SZX12.

Tab. 1: Konstrukty vytvořené vložением úseku genomické DNA o uvedené délce do expresního vektoru pPD95.75 a primery použité k jejich přípravě. Pozice primerů v rámci kosmidu *R03E1* je znázorněna na obr. 6.

Konstrukt	Primer 1	Primer 2	Délka insertu
7270	7112	7115	4169 pb
7271	7113	7115	3577 pb
7272	7114	7115	3252 pb



Obr. 7: Schematické znázornění genu *R03E1.1* (*sym-4*), mezigenového úseku a genu *R03E1.2*. Modré obdélníky představují exony. Šipky vyznačují místo a směr, kam „nasedají“ primery použité k přípravě amplikonu DNA, který byl vložen do vektoru pPD95.75. ATG a šipka vyznačují pozici a směr iniciačního kodonu. Primer 7115 „nasedá“ na templátové vlákno před terminačním kodonem.

3.1.1.2. Bakteriální linie

OP 50	„Divoká“ bakterie <i>Escherichia coli</i> používaná jako přirozená potrava <i>C. elegans</i> .
HT 115	<i>E. coli</i> nesoucí IPTG-inducibilní gen pro profákovou T7 RNA polymerasu. Tato linie má také deficienci RNasy III (enzym štěpící v bakteriálních buňkách většinu dsRNA).
TOP 10	Kompetentní buňky <i>E. coli</i> používané k transformaci plasmidové DNA.

3.1.2. Vektory

L4440	Vektor nesoucí gen pro resistenci na ampicilin a dva promotory pro T7 RNA polymerasu oddělené polylinkerem. Vektor věnoval Dr. Andrew Fire (Stanford University School of Medicine, Stanford CA, USA).
7388	Vektor L4440 do něhož bylo pomocí restrikčních endonukleas Sac I a Not I vloženo prvních 300 pb genu <i>R03E1.2</i> . Tento konstrukt jsem připravil během své bakalářské práce (14).

3.1.3. Primery

Primery použité pro stanovení exprese cílových genů metodou qPCR jsou spolu s jejich sekvencí uvedeny v tab. 2.

Tab. 2: Označení a sekvence primerů použitých pro qPCR stanovení exprese uvedených genů.

Označení	Cílový gen	Směr primeru	sekvence primeru
11/27	<i>ama-1</i>	kódující	gagtcataagatcgctcggaagatg
11/28	<i>ama-1</i>	antikódující	tgagaagccgctccgcagtag
7497	<i>R03E1.2</i>	kódující	caatgctgatgtttccgtgt
7498	<i>R03E1.2</i>	antikódující	aacgtctgcgacagcttctt
7640	<i>mab-5</i>	kódující	tctcgcaaccagtatttcca
7641	<i>mab-5</i>	antikódující	gtctgacgagtgcgtttga
7642	<i>lin-39</i>	kódující	acacgtgttcattcaactacagg
7643	<i>lin-39</i>	antikódující	tccagctctaatacttgattccttg
7644	<i>end-1</i>	kódující	ctcgtgagacaactctatggagaa
7645	<i>end-1</i>	antikódující	tcggaagtacagggagcaac
7646	<i>end-3</i>	kódující	ggatgtcgggaaacgaaat
7647	<i>end-3</i>	antikódující	cgttcgtaaagattacacggatt

3.1.4. Chemikálie

Roztoky:

10x PBS	32 g NaCl; 0,8 g KCl; 5,76 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,96 g KH ₂ PO ₄ ; rozpuštěno ve 400 ml H ₂ O; pH roztoku upraveno na 7,4
10x TBE	54 g Tris; 27,5 g H ₃ BO ₃ ; 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8); rozpuštěno v 0,5 l H ₂ O
Lyzační RNA pufr	10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA, 5% 2-merkaptetanol; 0,5% SDS; pH roztoku 7,5

Kultivační média:

Médium pro růst nematod (NGM)	7,0 g BactoAgar A; 0,8 g Pepton; 1,0 g NaCl; 333 µl roztoku cholesterolu (5 mg/ml etOH); doplněno H ₂ O na 333 ml; sterilizováno v autoklávu a následně přidáno 333 µl 1 M MgSO ₄ a 8,33 ml KH ₂ PO ₄
-------------------------------	---

Indukční NGM	7,0 g Agar A; 0,8 g Pepton; 1,0 g NaCl; 333 µl roztoku cholesterolu (5 mg/ml etOH); doplněno H ₂ O na 333 ml; sterilizováno v autoklávu a následně přidáno 333 µl 1 M MgSO ₄ ; 8,33 ml KH ₂ PO ₄ ; 333 µl ampicilin (100 mg/ml) a 333 µl 1 M IPTG.
LB médium	3,33 g Tryton; 1,67 g Yeast extract; 3,33 g NaCl; 333 µl 1 M NaOH; doplněno H ₂ O na 333 ml; sterilizováno v autoklávu
LB agar	5 g BactoAgar A; 3,33 g Tryton; 1,67 g Yeast extract; 3,33 g NaCl; 333 µl 1 M NaOH; doplněno H ₂ O na 333 ml; sterilizováno v autoklávu

Bioline:

Agarosa

DNA standard „Hyper Ladder I“

Bochemie:

Savo Original

Fermentas:

Reakční pufr „Tango buffer“

Restrikční endonukleasa Not I (10 U/µl)

Restrikční endonukleasa Sac I (10 U/µl)

NE Biolabs:

10x DNase buffer

DNase I (2 000 U/ml)

DNA standard „100 bp Ladder“

Promega:

Ampicilin (100 mg/ml)

„dNTP mix“ (roztok 10 mM ATP; 10 mM TTP; 10 mM CTP a 10 mM GTP)

DTT (0,1 M)

Proteinasa K (20 mg/ml)

Pufr pro transkripci *in vitro* „5x First Strand buffer“

„Random hexamer“ (roztok náhodných DNA dlouhých 6 pb)

Reakční Pufr „5x Transcriptional buffer“

RNA-dependentní DNA polymerasa „Super Script II“ (20 U/μl)

RNasin (40 U/μl)

„rNTP mix“ (roztok 2,5 mM rUTP; 2,5 mM rCTP; 2,5 mM rATP a 2,5 mM rGTP)

T7 RNA polymerasa (20 U/μl)

Roche:

Inhibitor RNas (40 U/μl)

Knihovna fluorescenčních sond pro qPCR stanovení „Universal Probe Library“ (UPL)

Souprava pro qPCR stanovení: LightCycler® TaqMan® Master Version 5.0 (Souprava obsahuje roztok „Master mix“)

Thermo Scientific:

Fenol/chloroform 1:1

Chloroform

3.1.5. Přístroje a vybavení

Centrifuga Micromax RF	IEC, USA
Inkubátor ECHO therm	Torrey, USA
Inkubátor Incucell	BMT, ČR
Mikroskop Olympus BX60	Olympus, Japonsko
Mikroskop Olympus Narishige	Olympus, Japonsko
Mikroskop Olympus SZX7	Olympus, Japonsko
qPCR cyklér LightCycler	Roche, Švýcarsko
Spektrofotometr DU 530	Beckman, USA
Spektrofotometr NanoDrop 2000	Thermo Scientific, USA
UV lampa Olympus U-RFL-T	Olympus, Japonsko
UV transiluminátor	UltraLum, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industrie, USA

3.2. Metody

3.2.1. Elektroforéza nukleových kyselin

2 % roztok agarosy v 0,5x TBE (zásobní roztok je 10x TBE) byl vařen do rozpuštění agarosy. Po zchlazení na přibližně 50 °C bylo přidáno 1,5 µl 1 % ethidium bromidu. Následně byl roztok nalit do připravené formy s vloženým hřebenem. Po ztuhnutí gelu a vyjmutí hřebenu byly do jamek aplikovány vzorky a DNA standard. Procházející proud byl nastaven na 90 V. Vyhodnocení elektroforézy bylo provedeno pomocí transiluminátoru UltraLum.

3.2.2. Fenol/chloroformová extrakce a etanolová precipitace

Objem zkumavky obsahující nukleové kyseliny byl doplněn sterilní vodou na 100 µl, následně bylo přidáno 60 µl směsi fenol/chloroform 1:1, roztok byl protřepán a následně centrifugován 5 min při 10 000 g. Horní fáze byla následně přenesena do nové zkumavky a stejný proces byl zopakován s použitím 60 µl čistého chloroformu. K horní fázi přenesené do nové zkumavky bylo přidáno 250 µl 95 % etanolu, 10 µl 3 M CH₃COONa a 1 µl glykogenu (20 mg/ml). Roztok byl ponechán přes noc při teplotě -80 °C a poté centrifugován 30 min při 15 000 g za teploty 4 °C. Supernatant byl následně odsát a zkumavka byla promyta 70 % etanolem. Po odpaření zbylého etanolu byla peleta rozpuštěna ve 12 µl sterilní vody.

3.2.3. Příprava synchronní populace *C. elegans*

Populace N2 (kap. 3.1.1.1.) pěstovaná na médiu pro růst nematod (NGM) (kap. 3.1.4.) a živěná bakteriemi OP 50 (kap. 3.1.1.2.) byla smyta sterilní vodou do 15 ml zkumavky a centrifugována 3 min při 1000 g, následně byl odsát supernatant a zkumavka byla opět doplněna sterilní vodou do 15 ml. Tímto způsobem byla kultura promyta celkem třikrát. Po třetím promytí byla zkumavka doplněna sterilní vodou do objemu 9 ml a současně byly přidány 2 ml 5 M NaOH a 1 ml Savo Original. Zkumavka byla třepána po dobu 6 min,

následně byl její objem rozdělen do dvou nových 15 ml zkumavek, doplněn sterilní vodou a opět třikrát promyt. Tímto způsobem byla získána embrya, která byla přes noc inkubována ve 12 ml 1x PBS při laboratorní teplotě a za stálého míchání. Následující den bylo možné použít pro další práci synchronní N2 populaci *C. elegans* ve stádiu L1.

3.2.4. Izolace celkové RNA z populace *C. elegans*

Synchronní populace N2 byla pěstována ve 24 °C na kultivačním médiu NGM obsahujícím agarosu místo agaru a živena OP 50. Po dosažení požadovaného vývojového stádia, které bylo vždy ověřeno mikroskopicky podle vývoje gonády, byla populace smyta sterilní vodou. Poté byla centrifugována 3 min při 1000 g, supernatant byl odsát a peleta byla zmrazena v -80 °C. Pro každé vývojové stádium byly takto připraveny tři vzorky z nezávisle kultivovaných populací.

Peleta byla rozmrazena v 0,5 ml lyzačního RNA pufru a poté bylo přidáno 12,5 µl proteinasy K o konc. 20 mg/ml. Směs byla „vortexována“ po dobu 60 vteřin a poté inkubována 60 min při teplotě 55 °C. Následně byl vzorek rozdělen do dvou zkumavek (označeny A a B) a byla provedena fenol-chloroformová extrakce a etanolová precipitace (postup viz kap. 3.2.2). Vzhledem k většímu množství buněčného lyzátu bylo při fenol-chloroformové extrakci a etanolové precipitaci oproti standardnímu postupu použito 180 µl směsi fenol/chloroform 1:1, 180 µl chloroformu, 750 µl 95 % etanolu, 30 µl 3 M CH₃COONa a 3 µl glykogenu (20 mg/ml). Peleta byla rozpuštěna ve 12 µl sterilní vody. Pro orientační stanovení koncentrace nukleových kyselin v jednotlivých vzorcích byla využita elektroforéza ve 2 % agarosovém gelu.

V následujícím kroku byla genomická DNA (gDNA) přítomná ve vzorku štěpena pomocí enzymu DNasa I. Složení reakční směsi, které bylo stejné pro všechny vzorky, bylo následující: 10,0 µl roztoku nukleových kyselin po etanolové precipitaci; 5,0 µl 10x DNase buffer (NE Biolabs); 5,0 µl DNasa I (NE Biolabs, 2 000 U/ml); 0,5 µl RNasový inhibitor (Roche, 40 U/µl) a 29,5 µl H₂O.

Vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C a poté byla provedena fenol/chloroformová extrakce DNA a její etanolová precipitace. Z každého vzorku byly 2 µl pomocí

elektroforézy rozděleny na 2 % agarosovém gelu, aby bylo ověřeno štěpení genomické DNA. Koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop 2000. Takto byly zpracovány vždy tři nezávislé vzorky celkové RNA pro populace *C. elegans* v jednotlivých vývojových stádiích.

3.2.5. Reverzní transkripce

Na reverzní transkripci byl použit vždy takový objem jednotlivých vzorků RNA, aby množství RNA v reakční směsi odpovídalo přibližně 1 µg. K tomuto množství RNA byly přidány 2 µl směsi náhodných hexamerů DNA a reakční směs byla doplněna sterilní vodou do celkového objemu 12 µl. Směs byla inkubována 5 min při 65 °C a poté zchlazena na ledu. Následně bylo k reakční směsi přidáno: 4 µl 5x First Strand buffer; 1 µl 0,1 M DTT; 1 µl dNTP mix; 1 µl RNasin a 1 µl Super Script II (viz kap. 3.1.4.) Takto připravená reakční směs byla inkubována 10 min při 25 °C, 60 min při 42 °C a následně ještě 5 min při 72 °C. Vzniklá cDNA byla uskladněna v -20 °C.

3.2.6. Kvantitativní polymerasová řetězová reakce (qPCR)

Jako templát pro qPCR stanovení exprese genu *R03E1.2* během vývoje *C. elegans* byla použita cDNA připravená podle postupu popsaného v kap. 3.2.4 až 3.2.5. Reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala 4 µl templátové cDNA, 4 µl „Master mixu“ (Roche) (kap. 3.1.4.), 2 µl „primer mixu“, 2 µl roztoku fluorescenční sondy z knihovny fluorescenčních sond (Roche) (kap. 3.1.4.) a 8 µl sterilní H₂O. Primer mix byl připraven smícháním 20 µl kódujícího primeru (konc. 25 µmol/l), 20 µl antikódujícího primeru (konc. 25 µmol/l) a 10 µl sterilní H₂O. Primery a fluorescenční sondy použité pro stanovení genu *R03E1.2* a referenčního genu *ama-1* jsou uvedeny v tab. 3.

Tab. 3: **Primery a fluorescenční sondy použité pro stanovení genů *R03E1.2* a *ama-1*.** Sekvence primerů viz. kap. 3.1.2.

Sledovaný gen	Kódující primer	Antikódující primer	Fluorescenční sonda
<i>R03E1.2</i>	7497	7498	#113
<i>ama-1</i>	11/27	11/28	DIXL

Zkumavky s reakční směsí byly umístěny do qPCR přístroje LightCycler (Roche), ve kterém byly inkubovány nejprve 10 min při teplotě 95 °C, a následně proběhlo 45 amplifikačních cyklů podle schéma:

1. 95 °C 15 sekund
2. 60 °C 30 sekund
3. 72 °C 1 sekunda

Během každého reakčního cyklu proběhla detekce fluorescenčního signálu při 540 a 630 nm, který je přímo úměrný koncentraci úseku DNA, který je během reakce amplifikován.

Pro porovnání exprese *R03E1.2* během vývoje *C. elegans* byly využity hodnoty tzv. „prahového cyklu“ (cP). Hodnoty cP představují počet amplifikačních cyklů potřebných k dosažení počítacem předem určené hraniční koncentrace stanovovaného úseku DNA ve vzorku. Z principu PCR pak vyplývá, že cP sledovaného genu v daném vzorku je v nepřímé úměře k množství templátu, který je v reakční směsi přítomen na začátku reakce. Počet kopií sledovaného genu v templátu (cDNA) odpovídá počtu kopií mRNA ve vzorku nukleových kyselin, který byl použit k přípravě tohoto templátu (cDNA).

Vzhledem k rozdílnému stupni degradace mRNA v jednotlivých vzorcích a různé efektivitě reverzní transkripce, bylo pro porovnání exprese studovaného genu mezi jednotlivými vzorky nutné provést normalizaci zjištěných hodnot cP pomocí normalizačního faktoru (fN) (rovnice 2). Pro výpočet fN (rovnice 1) bylo využito hodnot cP zjištěných v jednotlivých vzorcích pro gen, úroveň jehož exprese je během vývoje organismu konstantní. Pro tento experiment byl za tímto účelem zvolen gen s označením *ama-1*, kódující velkou podjednotku RNA polymerasy II (67). Exprese *R03E1.2* během vývoje *C. elegans* byla vztažena k expresi *R03E1.2* v dospělém *C. elegans* (rovnice 3).

Rovnice 1: **Výpočet normalizačního faktoru (fN):**

$$fN = \frac{cP_{ama}(embryo)}{cP_{ama}(vzorek)}$$

Rovnice 2: **Výpočet hodnot cP normalizovaných k *ama-1* (cP_{norm.}):**

$$cP_{norm.} = cP_{R03E1.2} \cdot fN$$

Rovnice 3: **Expresi *R03E1.2* během vývoje *C. elegans* vztažená k expresi *R03E1.2* v dospělém *C. elegans* (ΔcP):**

$$\Delta P = P_{\text{nom}}(\text{dospelý}) - P_{\text{nom}}(\text{vzorek})$$

3.2.7. Mikroskopie a lokalizace exprese *R03E1.2* pomocí zeleného fluorescenčního proteinu

Linie *C. elegans* 7270, 7271 a 7272 (viz. kap. 3.1.1.1.) byly pozorovány s využitím mikroskopů Olympus SZX12 a Olympus BX60 vybavenými fluorescenčními lampami. Mikroskop Olympus BX60 je zároveň vybaven fotoaparátem a kamerou. Mikroskop Olympus SZX12 umožňuje pozorování hádátek přímo na kultivačních plotnách, v případě BX60 byla hádátka pro vlastní mikroskopování přenesena do kapky vody umístěné na podložním skle s 2 % agarosou.

3.2.8. Příprava bakteriální kultury produkující dvouvláknovou RNA

Bakteriální kultura HT115 uchovávaná v tekutém dusíku byla rozmrazena na mokrém ledu. K 30 μ l rozmrzlé kultury byl přidán 1 μ l plasmidu, přičemž byl použit RNAi konstrukt 7388 a vektor L4440 jako kontrola. Po přidání plasmidu byly buňky ponechány na ledu ještě 20 minut, poté byly ponořeny na 45 sekund do lázně o teplotě 41 °C a následně byly na 2 minuty vráceny na led. Pak bylo k buňkám přidáno 0,5 ml LB média a následovala inkubace při 37 °C po dobu 30 min. Bakterie byly „očkovány“ na plotny s LB agarem, na které bylo předtím nanášeno 100 μ l ampicilinu (100 mg/ml) a inkubovány při teplotě 37 °C do dalšího dne.

Jednotlivé kolonie, které přes noc „narostly“ na plotnách s LB agarem, byly „očkovány“ do 30 ml LB media s ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml a inkubovány při 37 °C do nárůstu optické density při 600 nm na hodnotu přibližně 0,4. Poté bylo ke kultuře přidáno 12 μ l 1 M IPTG do výsledné koncentrace 0,4 mM. Kultura byla inkubována při 37 °C ještě 2 hodiny. Po uplynutí této doby bylo 500 ml indukované kultury nanášeno na „indukční plotny NGM“ (složení viz kap. 3.1.4.). Plotny byly ponechány při laboratorní teplotě do druhého dne, kdy byly využity ke kultivaci *C. elegans*. Případně byly uskladněny v 7 °C, kde byly drženy do doby spotřeby, nejdéle však po dobu jednoho týdne.

3.2.9. RNA-interference prováděná kultivací populace *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dvouvláknovou RNA

Synchronní populace *C. elegans* ve stádiu L1 připravená podle postupu popsaného v kapitole 3.2.1. byla přenesena na plotny obsahující indukovanou bakteriální kulturu, jejíž příprava je popsána v kap. 3.2.8. Larvy byly drženy při teplotě 24 °C a každých 24 hod byly přeneseny na čerstvé plotny s indukovanou kulturou, až do doby než larvy dorostly do stádia L4. Následně bylo na čerstvé plotny přeneseno vždy po deseti larvách a dále byl sledován vývoj potomků těchto larev, přičemž polovina z nich byla inkubována v 16 °C a polovina ve 24 °C.

Matky byly dvakrát denně přenášeny na čerstvé plotny a po přenesení byl vždy zaznamenán počet embryí nakladených na předchozí plotně. Následující den byl zaznamenán počet nevylíhnutých embryí a po pěti dnech byly spočítány přežívající larvy. Z takto získaných dat byla vypočtena embryonální a larvální letalita pro larvy držené v 16 °C a 24 °C.

3.2.10. Příprava dvouvláknové RNA *in vitro*

Jako templát pro transkripci *in vitro* byl během přípravy dvouvláknové RNA (dsRNA) využit plasmid 7388 (kap.3.1.3.). Linearizace plasmidu 7388 byla prováděna pomocí restrikčních endonukleas Sac I a Not I (reakční směs obsahovala vždy pouze jednu z uvedených endonukleas). Reakční směs o celkovém objemu 50,0 µl obsahovala 15,0 µl plasmidu 7388; 0,5 µl restrikční endonukleasy; 5 µl reakčního pufru (Tango buffer) a 29,5 µl H₂O. Reakce byla inkubována 4 hod při teplotě 37 °C. Následovala fenol/chloroformová extrakce linearizovaného plasmidu a jeho etanolvá precipitace (postup viz. kap. 3.2.2.). Koncentrace linearizovaného plasmidu byla měřena na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Pro vlastní transkripci *in vitro* byl použit takový objem linearizovaného plasmidu 7388, aby celkové množství templátu v reakční směsi odpovídalo 1 µg. Koncentrace plasmidu

7388 linearizovaného restriční endonukleasou Sac I nebo Not I a jeho objem použitý pro transkripci *in vitro* je uveden v tabulce 4.

Tab. 4: Koncentrace plasmidu 7388 linearizovaného restriční endonukleasou Sac I nebo Not I a jeho objem použitý na transkripci *in vitro*.

Endonukleasa použitá k linearizaci plasmidu	Koncentrace linearizovaného plasmidu	Objem použitý pro transkripci <i>in vitro</i>
Sac I	118,56 ng/μl	8,5 μl
Not I	75,66 ng/μl	14 μl

Kromě templátu, jehož množství v reakční směsi je uvedeno v tabulce 4, reakce obsahovala: 10,0 μl 5x transkripčního pufru (Transcriptional buffer) (Promega); 10,0 μl dNTP mixu (Promega); 5,0 μl DTT (100 mM, Promega); 1,25 μl RNasinu (40 U/ μl, Promega); 1,5 μl T7 RNA polymerasy (20 U/ μl, Promega) a sterilní H₂O do celkového objemu reakční směsi 50 μl.

Reakce byla inkubována 2 hod při 37 °C. Následně byl proveden „annealing“, kdy byly obě reakční směsi spojeny do jedné zkumavky a inkubovány 10 min při 70 °C a poté ještě 30 min při teplotě 22 °C. dsRNA byla purifikována metodou fenol/chloroformové extrakce a etanolové precipitace (postup viz kap. 3.2.2.). Vytvoření dsRNA bylo ověřeno pomocí gelové elektroforézy 1 μl vzorku. Koncentrace dsRNA byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop. Na injikování byla použita dsRNA o koncentraci 50 ng/μl.

3.2.11. RNA-interference prováděná injikováním dvouvláknové RNA do dospělých hermafroditů *C. elegans*

dsRNA připravená podle postupu popsaného v kap. 3.2.5. byla využita k navození ztráty funkce genu *R03E1.2* v potomstvu hermafroditů N2. Do gonád dospělých hermafroditů N2 byla dsRNA vpravována ve stádiu mladých dospělců pomocí mikroskopu Olympus Narishige vybaveného injektorem.

Jednotliví hermafroditi byli pěstováni na plotnách NGM při teplotě 24 °C a živeni bakteriemi OP 50. Ve 24 hodinových intervalech byli přenášeni na čerstvé plotny

a zároveň byl zaznamenán počet potomků, nakladených během uplynulého dne. Po dalších 24 hodinách byla na původních plotnách zaznamenána embryonální a larvální letalita.

3.2.12. Stanovení změny exprese Wnt-cílových genů metodou kvantitativní PCR v populaci *C. elegans* vystavené RNA-interferenci

Synchronní populace *C. elegans* ve stádiu L1 připravená podle postupu popsaneho v kapitole 3.2.3. byla přenesena na „indukční plotny NGM“ (složení viz kap. 3.1.4.) obsahující agarosu místo agaru, na které byla předchozí den „očkována“ bakteriální kultura produkující dsRNA (příprava viz kap. 3.2.8). U každého pokusu byla zvlášť zpracována populace kultivovaná na bakteriální kultuře transformované plasmidem L4440 (kontrola) a 7388 (RNA-interference).

Larvy byly drženy při teplotě 16 °C a v době kdy dosáhly dospělosti a začaly produkovat potomstvo, byly přeneseny na čerstvé agarosové „indukční plotny NGM“ s bakteriální kulturou produkující dsRNA. Z těchto ploten byli dospělci po 24 hod odstraněni. Potomstvo původních larev bylo inkubováno dalších 24 hod při teplotě 16 °C a následně bylo sklizeno a zmrazeno v -80 °C. Z takto připravených vzorků byla izolována celková RNA podle postupu popsaneho v kap. 3.2.4, která byla následně použita jako templát pro přípravu cDNA (postup viz kap. 3.2.5.).

Takto připravená cDNA byla v následujícím kroku použita pro qPCR stanovení změny exprese Wnt-cílových genů *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* vlivem RNA-interference genu *R03E1.2*. Dodržen byl stejný postup jako v kap. 3.2.6, pouze s využitím jiných primerů a fluorescenčních sond. Primery a fluorescenční sondy použité v tomto experimentu jsou uvedeny v tab. 5.

Tab. 5: **Primery a fluorescenční sondy použité pro sledované Wnt-cílové geny *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* a referenční gen *ama-1*.** Sekvence primerů viz. kap. 3.1.2.

Sledovaný gen	Kódující primer	Antikódující primer	Fluorescenční sonda
<i>mab-5</i>	7640	7641	39
<i>lin-39</i>	7642	7643	150
<i>end-1</i>	7644	7645	128
<i>end-3</i>	7646	7647	25
<i>ama-1</i>	11/27	11/28	DIXL

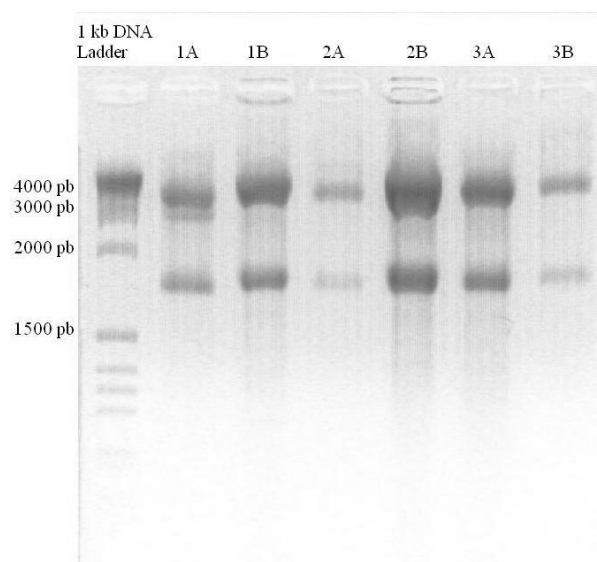
Celý experiment byl od přípravy bakteriální kultury produkující dsRNA až po vlastní qPCR stanovení proveden celkem třikrát.

4. Výsledky

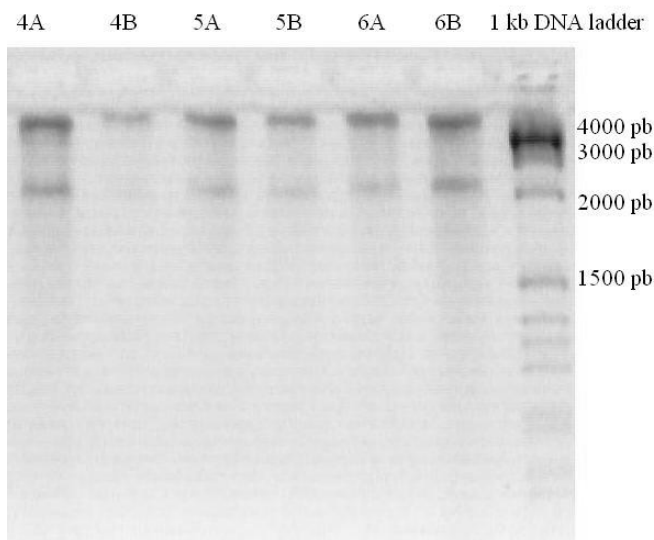
4.1. Izolace RNA ze synchronních populací *C. elegans* v jednotlivých vývojových fázích

Celková RNA byla z vývojově synchronních populací *C. elegans* izolována za účelem sledování exprese genu *R03E1.2* během vývoje organismu na úrovni mRNA. mRNA přítomná v celkové RNA izolované z populace *C. elegans* byla pomocí enzymu reverzní transkriptasy přepsána do komplementární DNA (cDNA), která byla s využitím genově specifických primerů využita jako templát pro kvantitativní PCR (qPCR).

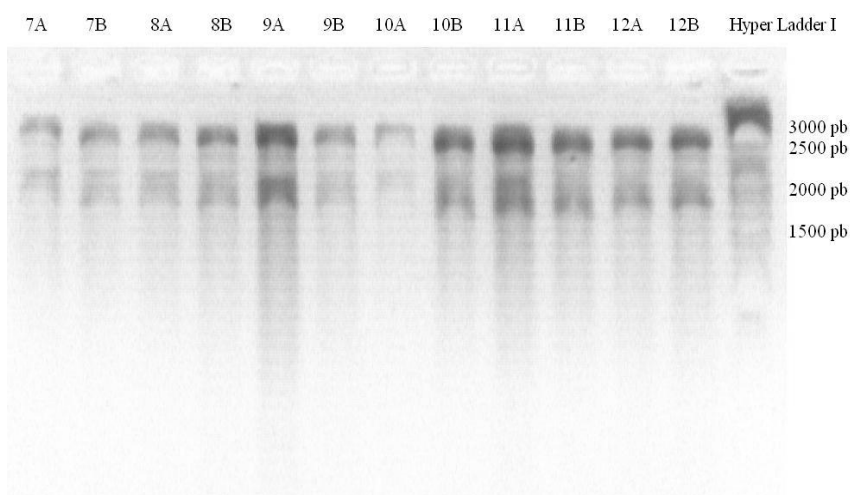
Obrázky 8 až 11 ukazují elektroforézu vzorků nukleových kyselin izolovaných z embryí, larev L1 až L4 a dospělců *C. elegans* po jejich inkubaci s DNasou I. Jedná se o vzorky nukleových kyselin, jenž byly v navazujícím kroku použity jako templát pro přípravu cDNA. Na obrázcích je patrná RNA velké a malé ribozomální podjednotky. mRNA představuje pouze asi 1 % nukleových kyselin přítomných ve vzorku. Na gelovou elektroforézu byly vždy naneseny 2 µl z celkových 12 µl vzorku izolované RNA a 5 µl standardu DNA.



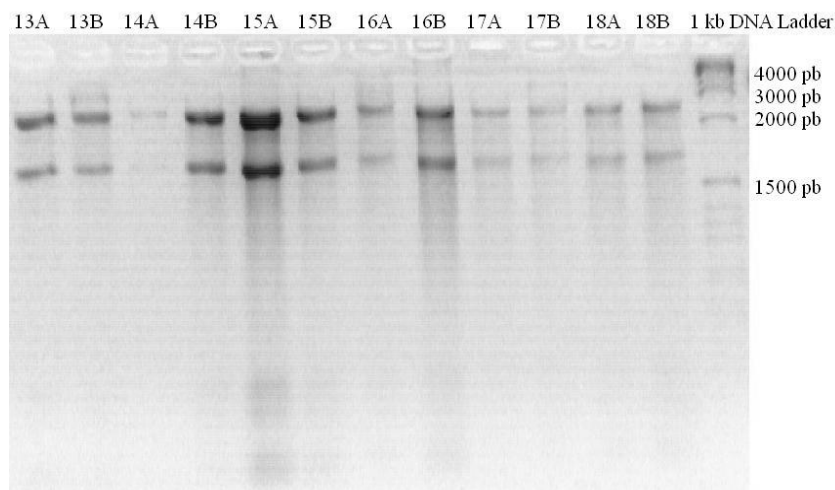
Obr. 8: RNA izolovaná z embryí *C. elegans* (dráha 1A až 3B). A a B označují vzorek získaný ze stejné populace *C. elegans*, která byla během izolace nukleových kyselin rozdělena do dvou zvlášť zpracovávaných zkumavek. Jako standard byl použit „1 kb DNA ladder“.



Obr. 9: **RNA izolovaná z larev *C. elegans* ve stádiu L2** (dráha 4A až 6B). A a B označují vzorek získaný ze stejné populace *C. elegans*, která byla během izolace nukleových kyselin rozdělena do dvou zvlášť zpracovávaných zkumavek. Jako standard byl použit „1 kb DNA ladder“.



Obr. 10: **RNA izolovaná z larev *C. elegans* ve stádiu L3** (dráha 7A až 9B) **a L4** (dráha 10A až 12B). A a B označují vzorek získaný ze stejné populace *C. elegans*, která byla během izolace nukleových kyselin rozdělena do dvou zvlášť zpracovávaných zkumavek. Jako standard byl použit „Hyper Ladder I“.



Obr. 11: **RNA izolovaná z dospělců *C. elegans*** (dráha 13A až 15B) **a larev ve stádiu L1** (dráha 16A až 18B). A a B označují vzorek získaný ze stejné populace *C. elegans*, která byla během izolace nukleových kyselin rozdělena do dvou zvlášť zpracovávaných zkumavek. Jako standard byl použit „1 kb DNA ladder“.

4.2. Exprese *R03E1.2* v jedincích *C. elegans* v jednotlivých vývojových fázích stanovená metodou kvantitativní PCR

Exprese genu *R03E1.2* během vývoje *C. elegans* byla sledována metodou qPCR za účelem identifikace vývojového stádia *C. elegans*, v němž je tento gen majoritně exprimován a tudíž, ve které vývojové fázi se *R03E1.2* nejvíce uplatňuje.

Rozdíl koncentrace mRNA genu *R03E1.2* mezi jednotlivými vývojovými stádii *C. elegans* byl vyjádřen jako ΔcP , tedy rozdíl normalizovaných hodnot cP pro gen *R03E1.2* nalezených v dospělcích a v ostatních vývojových stádiích. Za předpokladu, že v každém reakčním cyklu qPCR dochází v reakční směsi ke zdvojnásobení počtu kopií templátu, vyjadřují hodnoty $2^{\Delta cP}$ relativní poměr počtu kopií mRNA genu *R03E1.2* v jedincích *C. elegans* v jednotlivých vývojových stádiích. V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty cP zjištěné ze tří nezávislých experimentů a z nich vypočtené hodnoty normalizačního faktoru (fN); normalizované hodnoty cP ($cP_{norm.}$); ΔcP a $2^{\Delta cP}$ (vzorce pro jejich výpočet jsou uvedeny v postupu v kap. 3.2.6. viz rovnice 1, 2 a 3).

Tab. 6: Hodnoty cP zjištěné ze tří nezávislých qPCR pro geny *R03E1.2* a *ama-1* v jedincích *C. elegans* v jednotlivých vývojových stádiích; normalizační faktor (fN); hodnoty cP *R03E1.2* normalizované k *ama-1*; Δ cP a $2^{\Delta cP}$

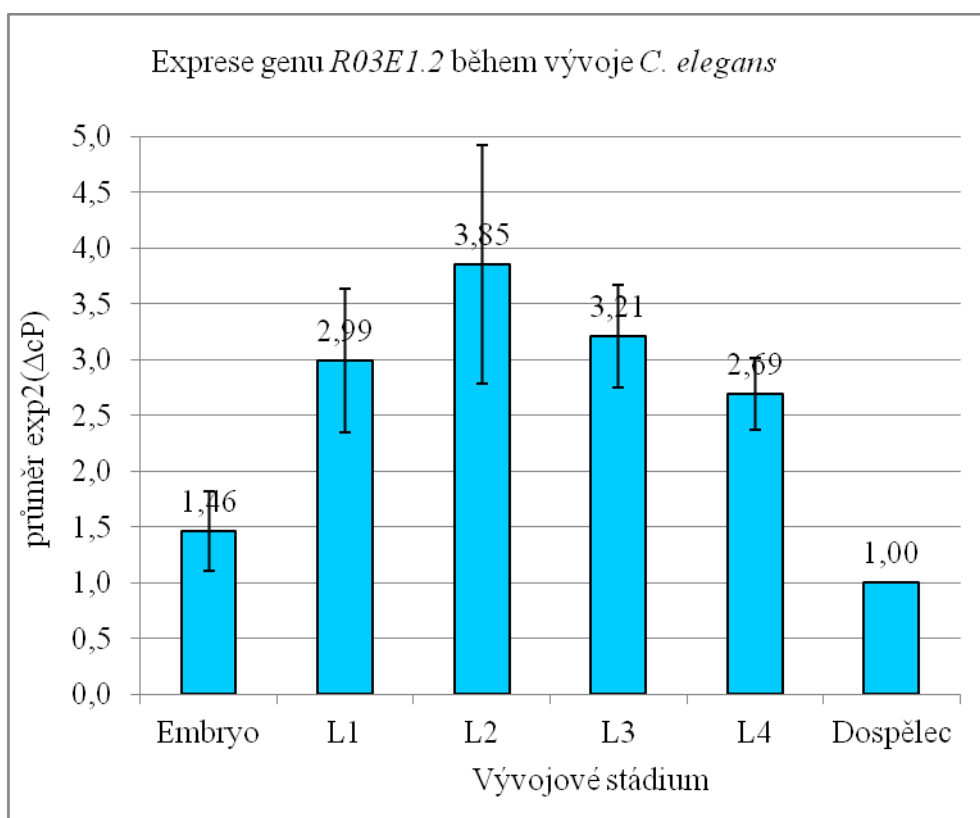
Měření	Vývojové stádium	cP <i>R03E1.2</i>	cP <i>ama-1</i>	fN	cP _{norm.}	Δ cP	$2^{\Delta cP}$
I.	embryo	19,64	25,86	1,000	19,64	0,53	1,44
	larva L1	19,59	26,79	0,965	18,91	1,26	2,39
	larva L2	19,22	27,14	0,953	18,31	1,85	3,62
	larva L3	19,55	27,38	0,944	18,46	1,70	3,26
	larva L4	19,69	26,90	0,961	18,93	1,24	2,36
	dospělec	21,01	26,94	0,960	20,17	0,00	1,00
II.	embryo	19,45	24,50	1,000	19,45	0,15	1,11
	larva L1	20,34	27,59	0,888	18,06	1,54	2,90
	larva L2	19,21	26,07	0,940	18,05	1,55	2,92
	larva L3	19,77	26,68	0,918	18,15	1,45	2,72
	larva L4	19,34	26,08	0,939	18,17	1,43	2,70
	dospělec	21,00	26,25	0,933	19,60	0,00	1,00
III.	embryo	19,72	25,89	1,000	19,72	0,87	1,83
	larva L1	19,29	26,69	0,970	18,71	1,88	3,67
	larva L2	19,24	27,28	0,949	18,26	2,33	5,02
	larva L3	19,22	26,58	0,974	18,72	1,87	3,65
	larva L4	19,27	26,26	0,986	19,00	1,59	3,01
	dospělec	20,70	26,03	0,995	20,59	0,00	1,00

V tabulce 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty $2^{\Delta cP}$ zjištěné ze tří nezávislých měření pro gen *R03E1.2* v jedincích *C. elegans* v jednotlivých vývojových stádiích. V tabulce 7 je dále uvedena směrodatná odchylka průměru $2^{\Delta cP}$ těchto tří měření.

Tab. 7: Průměrné hodnoty $2^{\Delta cP}$ zjištěné ze tří nezávislých měření pro gen *R03E1.2* v jedincích *C. elegans* v jednotlivých vývojových stádiích normalizované k *ama-1* a směrodatná odchylka průměru $2^{\Delta cP}$ těchto tří měření.

Vývojové stádium	průměr $2^{\Delta cP}$	Směrodatná odchylka
embryo	1,46	0,36
larva L1	2,99	0,64
larva L2	3,85	1,07
larva L3	3,21	0,46
larva L4	2,69	0,33
dospělec	1,00	0,00

V tomto experimentu bylo zjištěno, že exprese genu *R03E1.2* je v *C. elegans* během embryonálního vývoje a dospělosti přibližně stejná. V průběhu larválního vývoje *C. elegans* se však exprese genu *R03E1.2* trojnásobně zvyšuje, přičemž nejvyšší úroveň exprese je dosaženo v larválním stádiu L2, kdy je exprese *R03E1.2* v porovnání s dospělci téměř čtyřnásobná. Tyto výsledky shrnuje graf na obr. 12, ve kterém jsou uvedeny průměrné hodnoty $2^{\Delta\text{CP}}$ zjištěné ze tří nezávislých experimentů v jedincích *C. elegans* v jednotlivých vývojových stádiích.



Obr. 12: Průměrné hodnoty $2^{\Delta\text{CP}}$ zjištěné ze tří nezávislých experimentů pro gen *R03E1.2* v jedincích *C. elegans* v jednotlivých vývojových stádiích normalizované k *ama-1*. Chybové úsečky uvádí směrodatnou odchylku průměru $2^{\Delta\text{CP}}$ zjištěného během tří provedených experimentů.

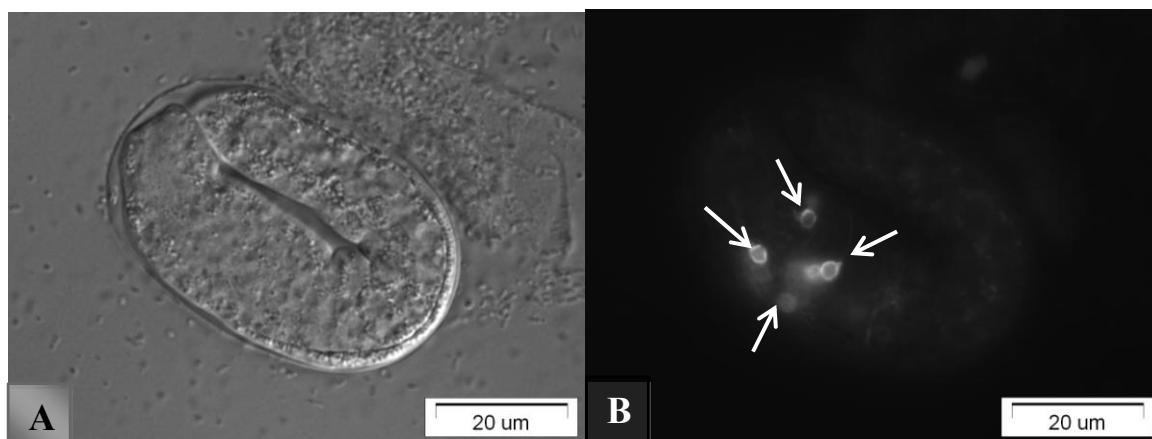
4.3. Lokalizace tkáňové exprese proteinu R03E1.2 v *C. elegans* s využitím zeleného fluorescenčního proteinu

Tkáňová exprese proteinu R03E1.2 byla zjišťována s využitím linií *C. elegans* 7270, 7271 a 7272 (bližší popis těchto linií viz kap. 3.1.1.1.), které exprimují R03E1.2 označený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Abychom určili tkáň a fázi životního cyklu *C.*

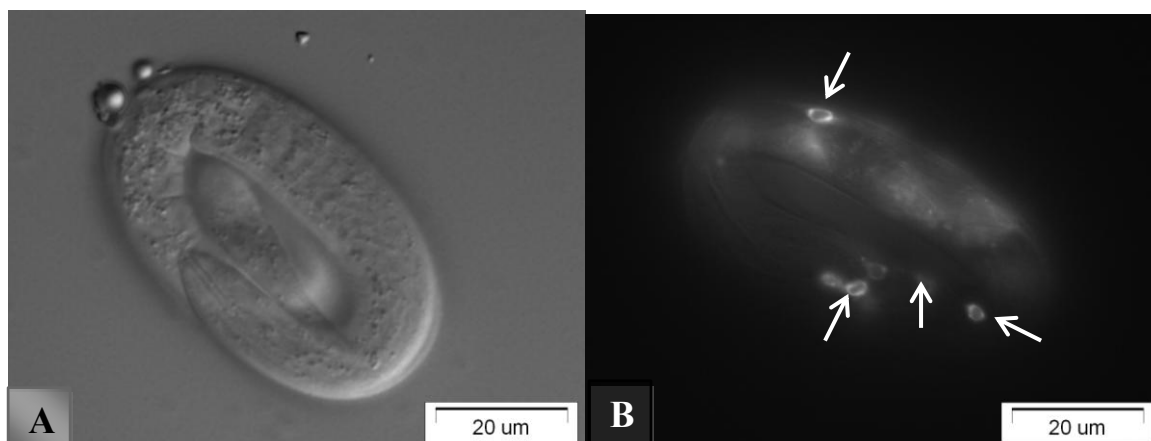
C. elegans, v níž je protein R03E1.2 exprimován, byla jeho exprese sledována zvláště během embryonálního vývoje, larválního vývoje a v dospělém *C. elegans* z linií 7270, 7271 a 7272. Sledování exprese zeleného fluorescenčního proteinu bylo prováděno pomocí mikroskopu Olympus BX60 vybaveného fluorescenční lampou Olympus U-RFL-T. U linií 7270, 7271 a 7272 byla exprese proteinu R03E1.2 označeného GFP pozorována ve stejných tkáních. Exprese proteinu R03E1.2 byla detekována zejména v apikální membráně trávicí trubice, ale také v cytoplasmatické membráně šestice hlavových neuronů a cytoplasmě enterocytů.

4.3.1. Exprese proteinu R03E1.2 v embryu *C. elegans*

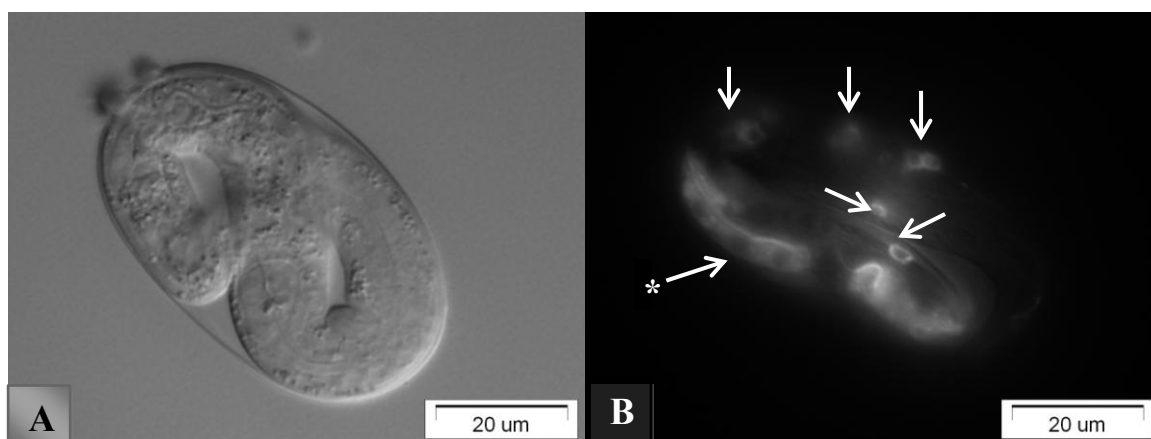
Exprese proteinu R03E1.2 je během embryonálního vývoje poprvé detekována ve stádiu tzv. „dvou ohybů“ (obr. 13). V této fázi embryogeneze byla exprese proteinu R03E1.2 detekována v cytoplasmatické membráně šesti buněk v anteriorní části těla (obr. 13). Zatím nebylo přesně určeno, o jaké buňky se jedná, s jistotou však lze říci, že nejde o enterocyty. Ve stádiu embryogeneze tzv. „tří ohybů“ byla exprese R03E1.2 detekována v cytoplasmatické membráně šesti anteriorních buněk (obr. 14 a 15), ale také v cytoplasmě střevních buněk a v membráně na jejich apikální straně (obr. 15).



Obr. 13: **Embryo *C. elegans* (linie 7272) ve stádiu tzv. „dvou ohybů“.** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipky označují buňky, v nichž je exprimován protein R03E1.2.



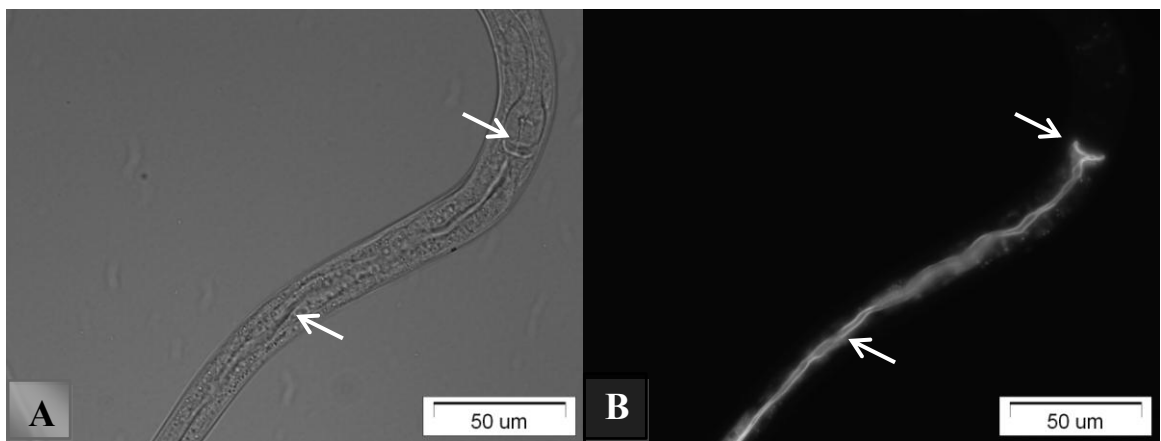
Obr. 14: **Embryo *C. elegans* (linie 7270) ve stádiu tzv. „tří ohybů“.** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipky označují buňky, v nichž je exprimován protein R03E1.2.



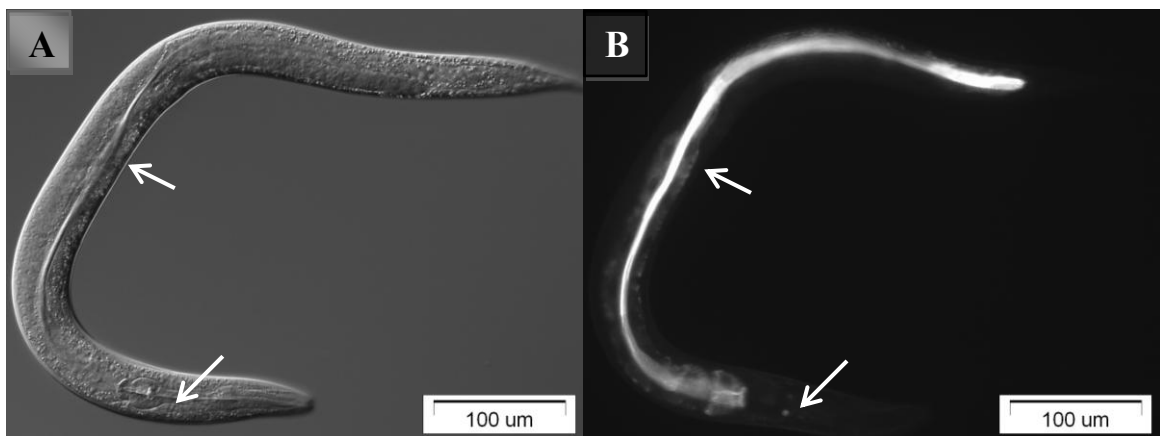
Obr. 15: **Embryo *C. elegans* (linie 7271) ve stádiu tzv. „tří ohybů“.** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipky označují buňky, v nichž je exprimován protein R03E1.2. Šipka označená * označuje enterocyty v jejichž cytoplasmě je exprimován protein R03E1.2 (tmavé skvrny představují jádra). Exprese R03E1.2 je viditelná i v apikální membráně již zformované trávicí trubice.

4.3.2. Exprese proteinu R03E1.2 v larvách *C. elegans*

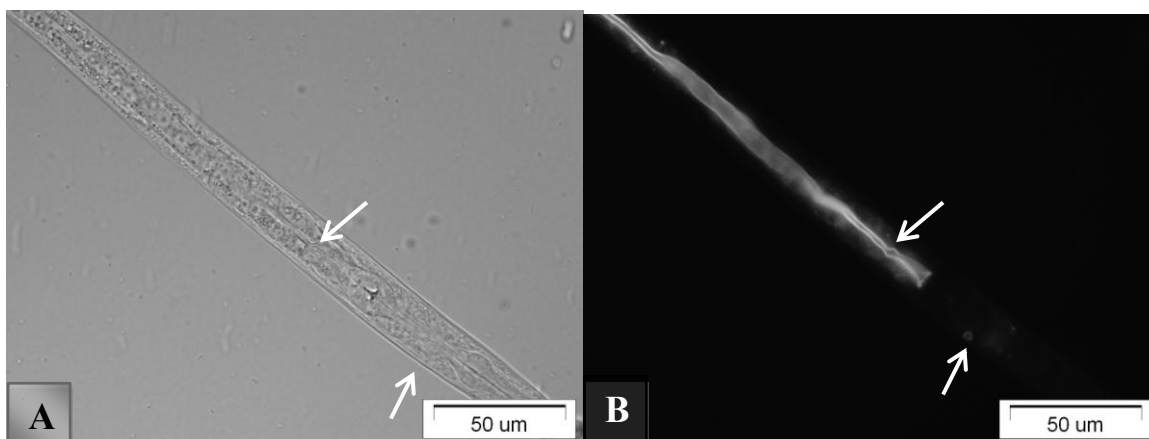
Během larválního vývoje *C. elegans* je protein R03E1.2 exprimován zejména v apikální membráně trávicí trubice (obr. 16 až 19). Exprese proteinu R03E1.2 však byla zaznamenána i v cytoplasmatické membráně šesti hlavových neuronů (obr. 18 až 20) a cytoplasmě enterocytů (obr. 16 až 19). Na obr. 20 je uveden detail hlavy larvy *C. elegans*, na kterém je patrné všech šest neuronů, v jejichž cytoplasmatické membráně je exprimován protein R03E1.2.



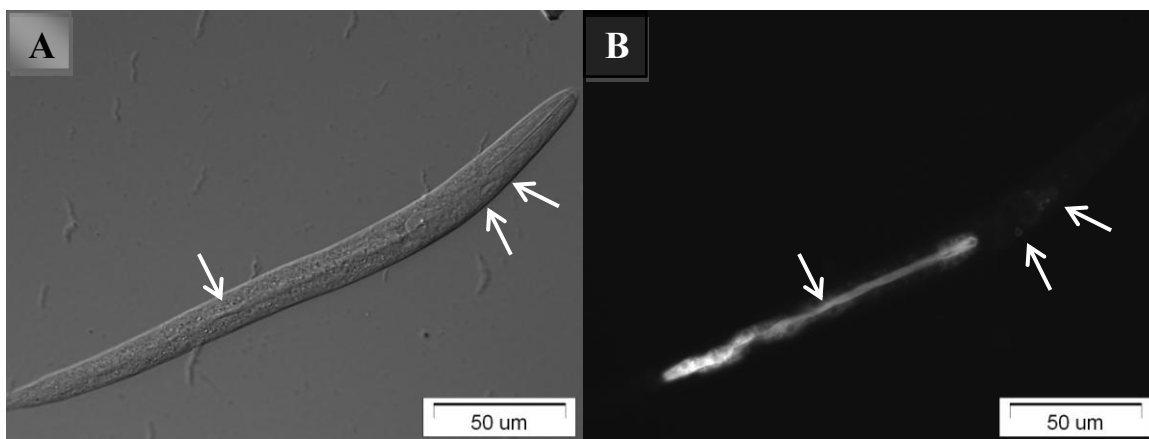
Obr. 16: Larva *C. elegans* ve stádiu L2 (linie 7270). V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo dole označuje expresi proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice. Šipka vpravo nahoře označuje místo, kde trávicí trubice „nasedá“ na jícn.



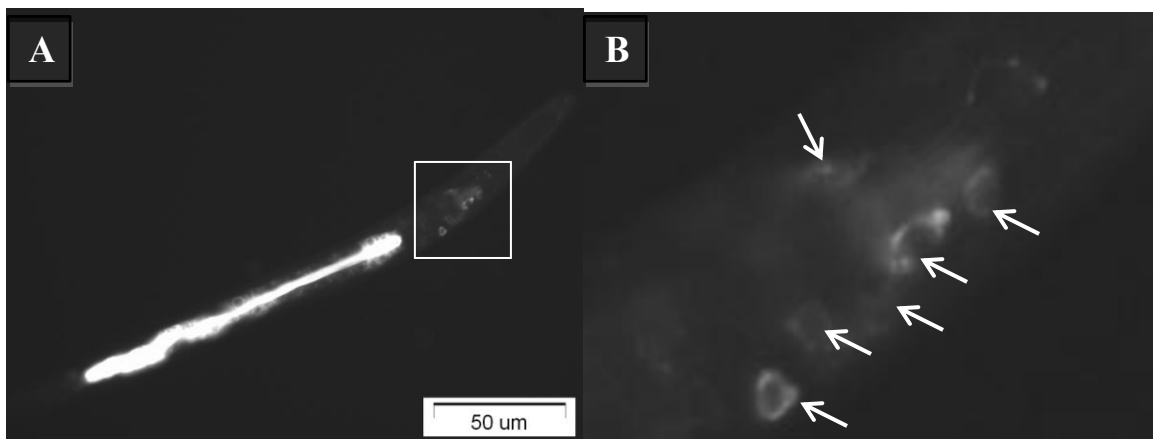
Obr. 17: Larva *C. elegans* ve stádiu L4 (linie 7271). V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo nahoře označuje expresi proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice. Šipka vpravo dole označuje expresi proteinu R03E1.2 v neuronech hlavy.



Obr. 18: **Larva *C. elegans* ve stádiu L2 (linie 7272).** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo nahoře označuje expresi proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice. Šipka vpravo dole označuje expresi proteinu R03E1.2 v neuronu hlavy.



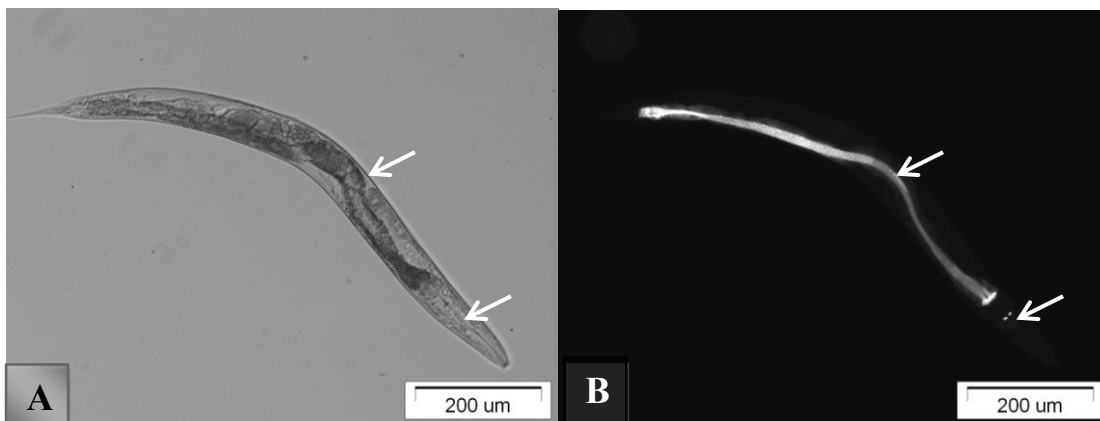
Obr. 19: **Larva *C. elegans* ve stádiu L3 (linie 7272).** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo označuje expresi proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice. Šipka uprostřed a vpravo označuje expresi proteinu R03E1.2 v neuronech hlavy.



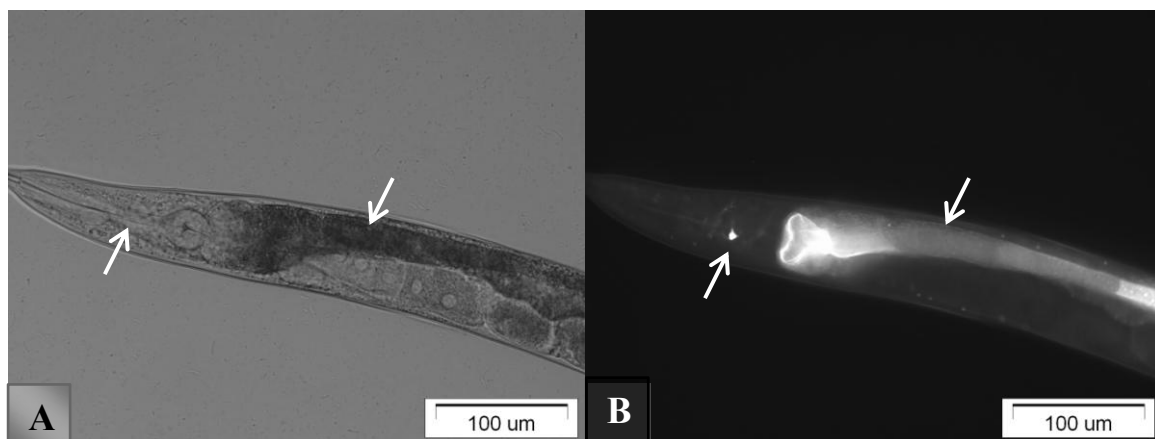
Obr. 20: **Larva *C. elegans* ve stádiu L3 (linie 7272).** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T s dvojnásobnou délkou expozice (10 s oproti 5 s). V části B je detail výřezu označeného v části A. V části B je šípkami zvýrazněna exprese proteinu R03E1.2 v cytoplasmatické membráně šesti neuronů hlavy.

4.3.3. Exprese proteinu R03E1.2 v dospělých *C. elegans*

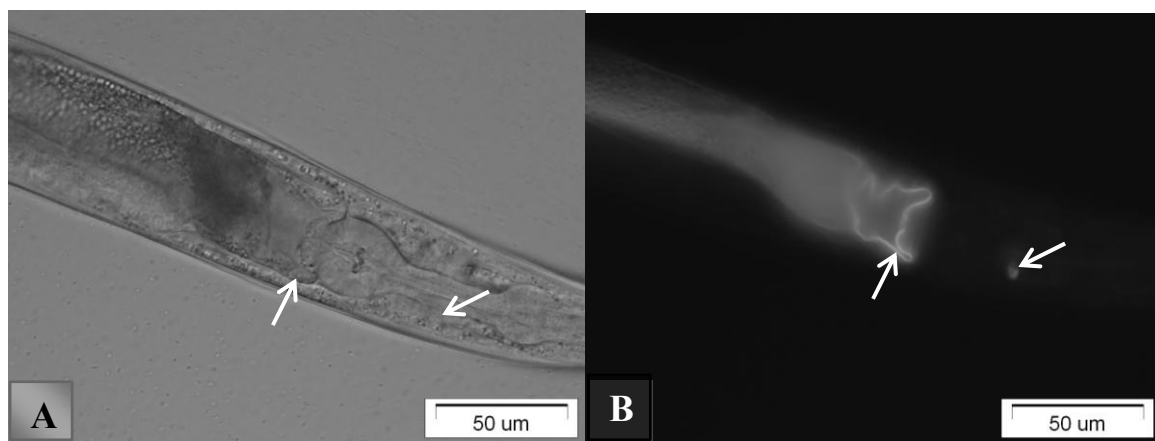
Tkáňová exprese proteinu R03E1.2 je v dospělých *C. elegans* stejná jako během larválního vývoje. Protein R03E1.2 je majoritně exprimován v apikální membráně trávicí trubice, jeho exprese však byla zachycena i v neuronech hlavy. Na obr. 21 až 23 jsou uvedeny snímky dokumentující expresi proteinu R03E1.2 je v dospělých *C. elegans*.



Obr. 21: **Dospělec *C. elegans* (linie 7272).** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo nahoře označuje expresi proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice. Šipka vpravo dole označuje expresi proteinu R03E1.2 v neuronech hlavy.



Obr. 22: **Dospělec *C. elegans* (linie 7272).** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vpravo označuje expresi proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice. Šipka vlevo označuje expresi proteinu R03E1.2 v neuronu hlavy.



Obr. 23: **Dospělec *C. elegans* (linie 7271).** V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo označuje expresi proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice. Šipka vpravo označuje expresi proteinu R03E1.2 v neuronu hlavy.

4.4. Studium funkce genu *R03E1.2* post-translačním umlčováním genové exprese metodou RNA-interference

4.4.1. RNA-interference prováděná kultivací populace *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dvouvláknovou RNA

V tomto experimentu byla studována funkce genu *R03E1.2* zablokováním jeho transkripce s využitím RNA-interference (RNAi). Vliv RNAi genu *R03E1.2* byl sledován na potomstvu hermafroditů *C. elegans* kultivovaných na bakteriální kultuře produkující dvouvláknovou RNA (dsRNA). Bakteriální kultura produkující dsRNA byla připravena

transformací plasmidu 7388 (viz kap. 3.1.2.) do bakteriálních buněk HT115 a indukci syntézy dsRNA pomocí IPTG podle postupu popsaného v kap. 3.2.9. Jako kontrola sloužila u tohoto experimentu populace *C. elegans* kultivovaná na bakteriální kultuře transformované vektorem L4440 (viz kap. 3.1.2.).

V tab. 8 je uvedeno shrnutí vývoje populací *C. elegans*, které byly kultivovány při teplotách 24 °C a 16 °C. Během experimentu byl zaznamenán celkový počet potomků *C. elegans* kultivovaných na bakteriálních kulturách produkujících dsRNA a jejich embryonální a larvální letalita. Embryonální i larvální letalita, v populaci *C. elegans* kultivované při 24 °C, se prakticky nelišila od embryonální a larvální letality v populaci kontrolní (u všech do 1,5 %).

V populaci *C. elegans* vystavené RNAi, která byla kultivována při teplotě 16 °C, byla zaznamenána embryonální letalita 3,5 % (v kontrolní populaci 1 %), ale larvální letalita až 10 % (v kontrolní populaci pod 1 %). U larev *C. elegans* vystavených RNAi se oproti kontrolním jedincům nepodařilo zaznamenat žádné morfologické změny. Vývoj larev *C. elegans* vystavených RNAi byl v porovnání s kontrolou zpomalen o přibližně jedno larvální vývojové stádium (tedy 6 až 8 hod).

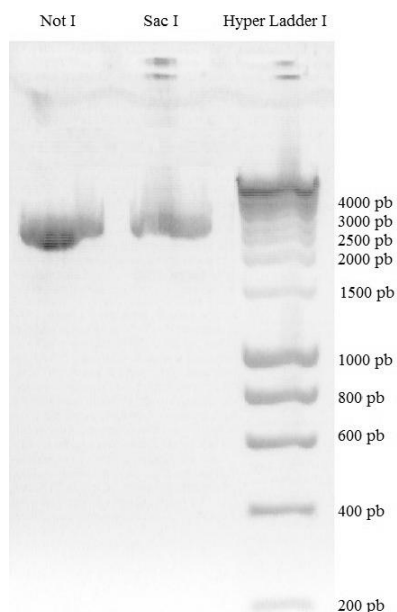
Tab. 8: Vývoj populací *C. elegans* kultivovaných na bakteriálních kulturách produkujících dsRNA. Tabulka uvádí teplotu a bakteriální kulturu, na níž byla populace *C. elegans* kultivována (L4440 = kontrola, 7388 = RNA-interference); celkový počet sledovaných jedinců *C. elegans*; počet embryí, která se nevylíhla do 24 hod od jejich naklazení; procento larvální letality; počet larev přežívajících do dosažení dospělosti a procento larvální letality.

Teplota kultivace	Bakteriální kultura	Počet sledovaných potomků	Nevylíhnutá embrya	Embryonální letalita [%]	Vyvinutí dospělci	Larvální letalita [%]
24 °C	L4440	1722	16	0,9	1722	0,0
	7388	1638	25	1,5	1629	0,5
16 °C	L4440	1466	15	1,0	1459	0,5
	7388	1049	17	3,5	941	10,3

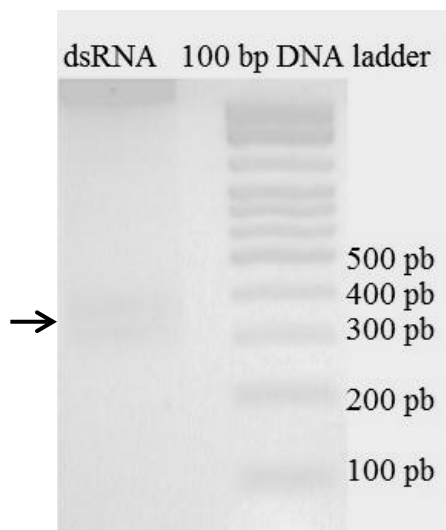
4.4.2. Příprava dvouvláknové RNA použité pro inhibici genu *R03E1.2*

Vzhledem k tomu, že při kultivaci *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dsRNA inhibující gen R03E1.2 se nepodařilo určit, jaká tkáň je RNAi tohoto genu nejvíce zasažena, rozhodli jsme se gen R03E1.2 inhibovat injikováním dsRNA připravené transkripcí *in vitro* přímo do gonád dospělých hermafroditů *C. elegans* a sledovat vývoj jejich potomků.

Obr. 24 a 25 dokumentují kvalitu dsRNA připravené *in vitro*. Na obr. 24 je uvedena elektroforéza konstruktů 7388 linearizovaných pomocí restrikční endonukleasy Not I respektive Sac I, který byl použit jako templát pro transkripci *in vitro*. Na obr. 25 je uvedena elektroforéza dvouvláknové RNA, která byla připravena „spojením“ dvou jednovláknových RNA připravených transkripcí *in vitro*. Očekávaná velikost dsRNA byla ~350 pb.



Obr. 24: **Elektroforéza konstruktů 7388 linearizovaných pomocí restrikčních endonukleas Not I a Sac I.** Jako DNA marker byl použit „Hyper Ladder I“. Velikost konstruktů 7388 je ~3100 pb.



Obr. 25: **Elektroforéza dsRNA připravená transkripcí *in vitro*.** Jako DNA marker je použit „100 bp DNA ladder“. Očekávaná velikost dsRNA byla ~350 pb.

4.4.3. RNA-interference prováděná injikováním dvouvláknové RNA inhibující gen *R03E1.2* do *C. elegans*

Pro navození ztráty funkce genu *R03E1.2* v *C. elegans* byla do gonád dospělých hermafroditů *C. elegans* injikována dsRNA připravená transkripcí *in vitro*. Potomstvo injikovaných hermafroditů, u kterého došlo k inhibici genu *R03E1.2*, bylo sledováno s využitím mikroskopů Olympus BX60 a Olympus SZX7.

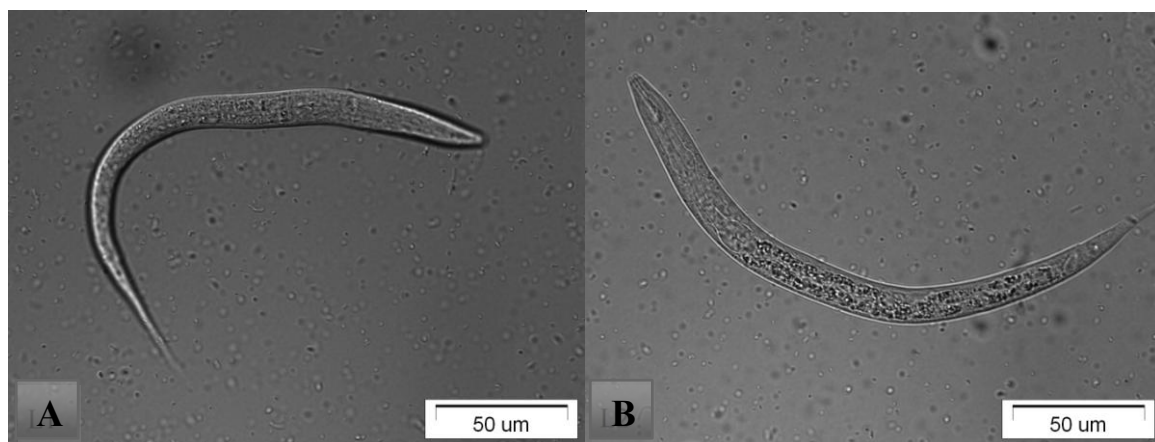
Následkem injikování dsRNA inhibující gen *R03E1.2* do gonád dospělých hermafroditů *C. elegans*, došlo u jejich potomstva ke zpomalení vývoje, embryonální letalitě a larvální letalitě. V tomto experimentu bylo též potvrzeno, že míra poškození závisí u jedinců *C. elegans* vystavených inhibici genu *R03E1.2* na teplotě, při níž jsou kultivováni. Při kultivaci ve 24 °C je embryonální letalita 8 % a larvální 71 %, při kultivaci v 16 °C však dosahuje embryonální letalita 11 % a larvální až 84 %. Shrnutí vývojových defektů v populaci *C. elegans* vystavené RNAi kultivované při 24 °C a při 16 °C je uvedeno v tab. 9.

Tab. 9: **Vývoj potomstva hermafroditů *C. elegans*, do jejichž gonád byla injikována dsRNA inhibující gen *R03E1.2*.** Tabulka uvádí teplotu, při níž byla populace *C. elegans* kultivována; celkový počet sledovaných jedinců *C. elegans*; počet embryí, která se nevylíhla do 24 hod od jejich naklazení; procento larvální letality; počet larev přežívajících do dosažení dospělosti a procento larvální letality.

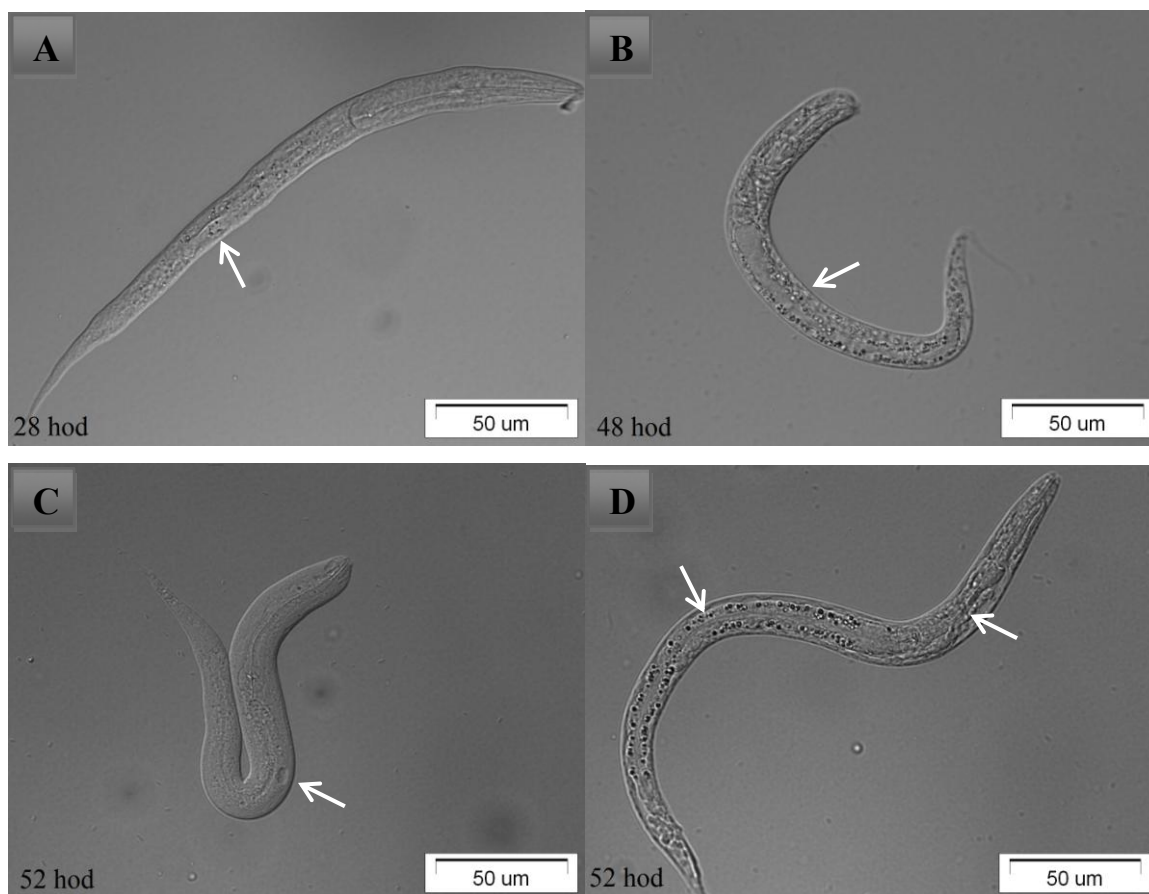
Teplota kultivace	Počet sledovaných potomků	Nevylíhnutá embrya	Embryonální letalita [%]	Vyvinutí dospělci	Larvální letalita [%]
24 °C	1458	122	8	394	71
16 °C	1446	148	11	203	84

4.4.3.1. Změny fenotypu larev *C. elegans* vyvolané vlivem RNA-interference inhibující gen *R03E1.2*

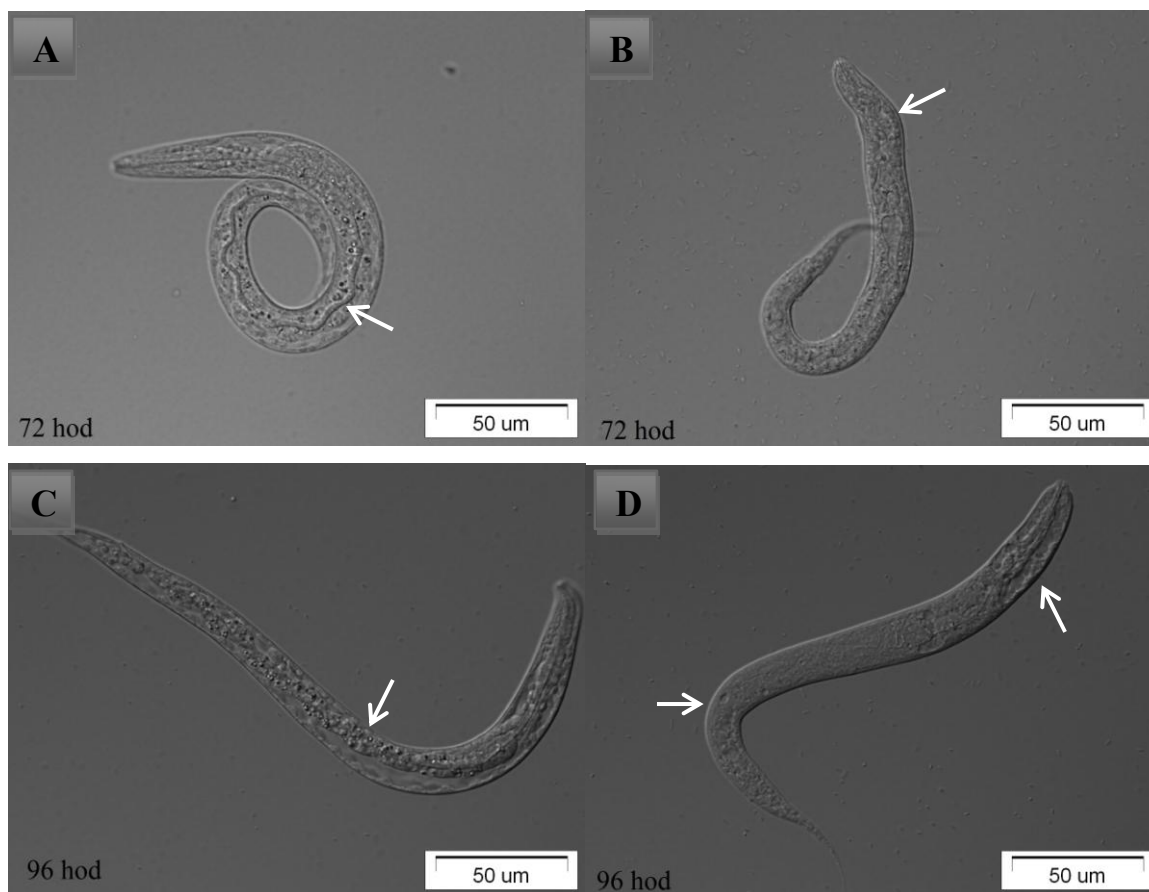
Na obr. 26 jsou pro srovnání s larvami *C. elegans* vystavenými RNAi genu *R03E1.2* uvedeny kontrolní larvy *C. elegans* ve stádiu L1 a L2 kultivované při teplotě 16 °C a staré 16 a 28 hod. U larev *C. elegans* vystavených RNAi genu *R03E1.2* dochází ke vzniku vakuol (obr. 27 a 28), některé larvy vykazují tzv. fenotyp „dumpy“ (obr. 27 B; 27 D a 28 B), což znamená, že larvy jsou oproti kontrolním jedincům kratší a silnější. U těchto larev dochází také k nepřirozenému zvýraznění trávicí trubice (obr. 27 A), což však může být i nespecifickým důsledkem nekrózy. Vývoj *C. elegans* je navíc vlivem RNAi genu *R03E1.2* zastaven v larválním stádiu L1 přibližně po dobu pěti dnů. Po uplynutí této doby jsou přežívající larvy vystavené RNAi schopny se vyvinout do dospělosti a mít potomstvo, které již není nijak poškozené a které se vyvíjí stejně rychle jako kontrolní populace.



Obr. 26: **Kontrolní larvy *C. elegans*.** V části A obrázku je larva ve stádiu L1 stará 16 hod. V části B je larva ve stádiu L2 stará 28 hod.



Obr. 27: Larvy *C. elegans* poškozené vlivem RNAi genu *R03E1.2* kultivované při teplotě 16 °C a staré 28 až 52 hod. V levém dolním rohu je uvedeno stáří dané larvy. Šipky označují vakuoly vznikající v těle larev.



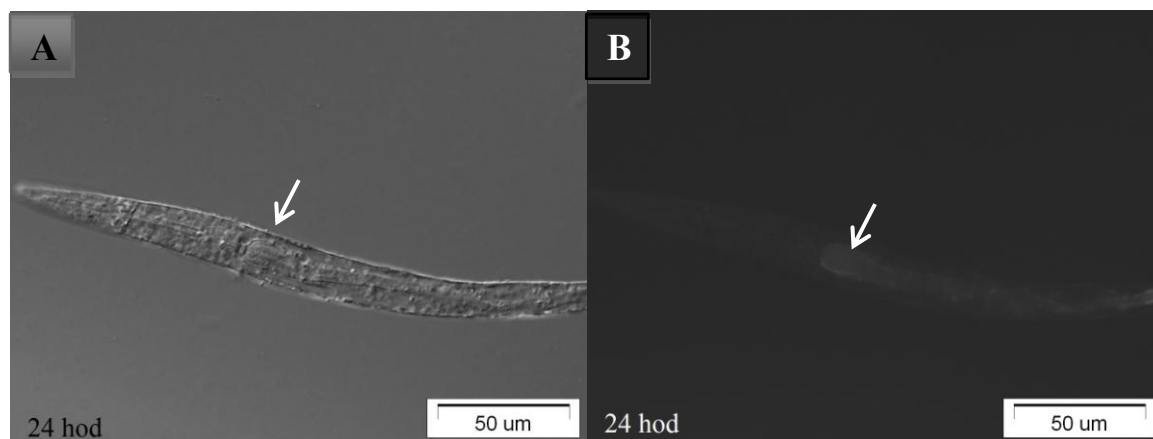
Obr. 28: Larvy *C. elegans* poškozené vlivem RNAi genu *R03E1.2* kultivované při teplotě 16 °C a staré 72 až 96 hod. V levém dolním rohu je uvedeno stáří dané larvy. Šipka na snímku A označuje nepřírozané zvýraznění trávicí trubice, na snímcích B, C a D označují šipky vakuoly vznikající v těle larev.

4.4.4. RNA-interference prováděná injikováním dvouvláknové RNA inhibující gen *R03E1.2* do linie *C. elegans* 7272

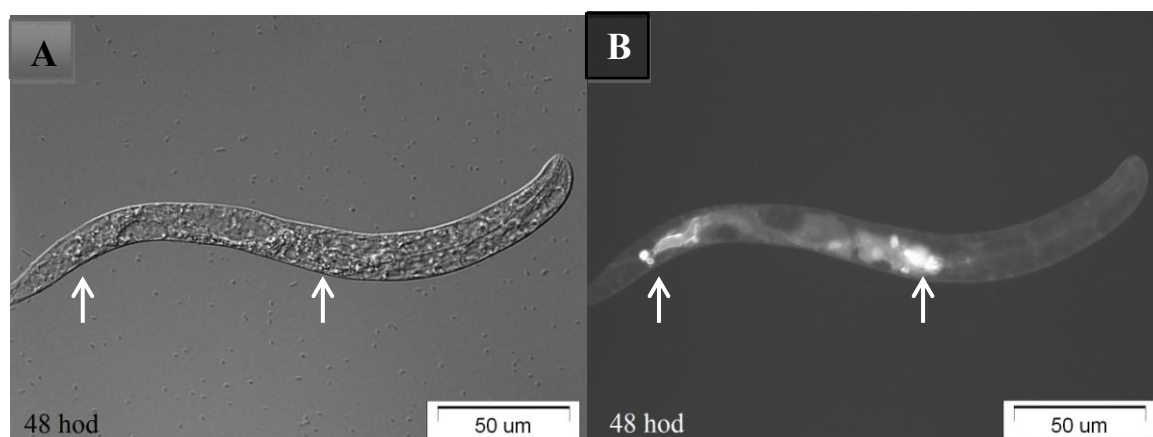
Tento experiment byl prováděn za účelem určení poškození tkání, ve kterých je protein R03E1.2 exprimován, vlivem inhibice genu *R03E1.2*. K tomuto účelu byla využita *C. elegans*, linie 7272 (popis linie viz kap. 3.1.1.1), exprimující protein R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice, cytoplasmě enterocytů a šesti hlavových neuronech. Dokumentace exprese proteinu R03E1.2 v nepostižených larvách *C. elegans* linie 7272 je uvedena v kap. 4.3.2 na obr. 18 až 20.

V uvedeném experimentu byl sledován vývoj potomků hermafroditů *C. elegans* linie 7272, do jejichž gonád byla injikována dsRNA inhibující gen *R03E1.2*. U sledovaných jedinců

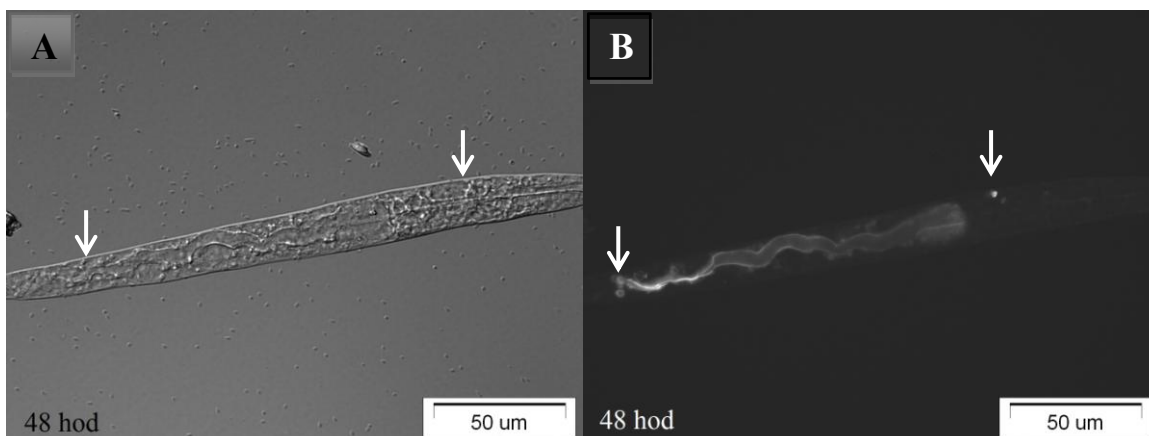
došlo k oslabení intenzity fluorescenčního signálu pozorovaného v apikální membráně trávicí trubice a stejně tak v neuronech hlavy (obr. 29 až 32). Expres fluorescenčního proteinu byla zaznamenána ve vakuolách, které se tvoří v enterocytech (obr. 30 až 32).



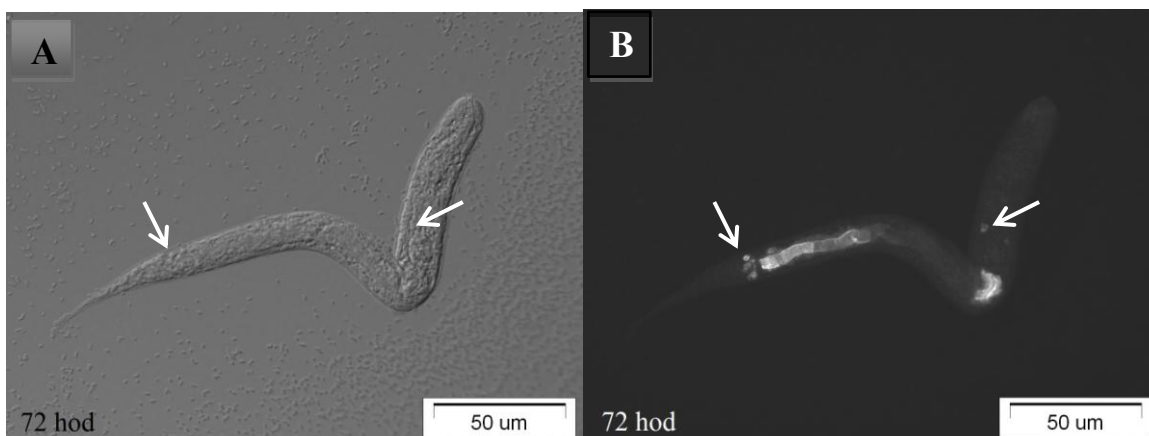
Obr. 29: Larva *C. elegans* linie 7272 ve stádiu L1 poškozená vlivem RNAi genu *R03E1.2*. Stáří larvy je 24 hod. V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka označuje trávicí trubici.



Obr. 30: Larva *C. elegans* linie 7272 ve stádiu L1 poškozená vlivem RNAi genu *R03E1.2*. Stáří larvy je 48 hod. V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipky označují vakuoly tvořící se ve střevních buňkách, v nichž je detekována exprese fluorescenčního proteinu.



Obr. 31: Larva *C. elegans* linie 7272 ve stádiu L1 poškozená vlivem RNAi genu *R03E1.2*. Stáří larvy je 48 hod. V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo označuje vakuoly tvořící se ve střevních buňkách, šipka vpravo označuje hlavový neuron, v němž je fluorescenční signál detekován.



Obr. 32: Larva *C. elegans* linie 7272 ve stádiu L1 poškozená vlivem RNAi genu *R03E1.2*. Stáří larvy je 72 hod. V části A obrázku je snímek pořízený pomocí Nomarského optiky, v části B je snímek pořízený pomocí fluorescenční lampy Olympus U-RFL-T. Šipka vlevo označuje vakuoly tvořící se ve střevních buňkách, šipka vpravo označuje hlavový neuron, v němž je fluorescenční signál detekován.

4.4.5. Stanovení změny exprese „Wnt-cílových genů“ metodou kvantitativní PCR v populaci *C. elegans* vystavené RNA-interferenci genu *R03E1.2*

Vhledem k prokázání účasti proreninového receptoru (PRR) v buněčné signalizaci Wnt u tak evolučně vzdálených systémů jako jsou lidské mesangiální buňky, octomilka a embryo drápatky (56), (57), byla v rámci této diplomové práce studována účast homologue PRR ve Wnt signalizaci organismu *C. elegans*. Za tímto účelem byla připravena cDNA

z kontrolní populace *C. elegans* (označena L4440) a z populace *C. elegans* vystavené RNAi genu *R03E1.2* (označena 7388). RNAi byla navozena kultivací populace *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dsRNA. Tyto cDNA byly následně využity pro qPCR stanovení „Wnt-cílových genů“ *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* a porovnání rozdílů jejich exprese mezi kontrolní a RNAi populací *C. elegans*. Jako referenční gen byl v tomto experimentu zvolen gen *ama-1*, jehož exprese není regulována pomocí buněčné signalizace Wnt (67).

V tab. 10 jsou uvedeny hodnoty cP pro gen *mab-5*, *lin-39*, *end-1*, *end-3* a *ama-1* zjištěné ve třech nezávisle připravených kontrolních populacích *C. elegans* (L4440) a v populacích vystavených inhibici genu *R03E1.2* (7388). Z hodnot cP zjištěných pro gen *ama-1* (cP_{ama-1}) byly dle rovnice 4 vypočteny normalizační faktory pro jednotlivá měření (fN), dle rovnice 5 byl proveden výpočet normalizovaných hodnot cP ($cP_{norm.}$). Tyto hodnoty jsou též uvedeny v tab. 10.

Rovnice 4: **Výpočet normalizačního faktoru (fN).**

$$fN = \frac{cP_{ama-1}(L4440)}{cP_{ama-1}(7388)}$$

Rovnice 5: **Výpočet hodnot cP normalizovaných k *ama-1* ($cP_{norm.}$).**

$$cP_{norm.} = cP_{gen} \cdot fN$$

Tab. 10: Hodnoty cP zjištěné během tří nezávislých qPCR pro gen *mab-5*, *lin-39*, *end-1*, *end-3* a *ama-1* v kontrolní populaci *C. elegans* (L4440) a v populaci vystavené inhibici genu *R03E1.2* (7388); normalizační faktor (fN) a hodnoty cP normalizované k *ama-1* (cP_{norm.})

Experiment	Vzorek	Gen	cP	cP _{ama-1}	fN	cP _{norm.}
I.	7388 (pokus)	<i>mab-5</i>	27,92	23,53	0,89	24,79
		<i>lin-39</i>	27,37			24,30
		<i>end-1</i>	32,61			28,95
		<i>end-3</i>	24,32			21,59
	L4440 (kontrola)	<i>mab-5</i>	26,89	20,89	1,00	26,89
		<i>lin-39</i>	25,96			25,96
		<i>end-1</i>	26,35			26,35
		<i>end-3</i>	20,51			20,51
II.	7388 (pokus)	<i>mab-5</i>	27,70	22,56	1,05	29,16
		<i>lin-39</i>	27,14			28,57
		<i>end-1</i>	28,99			30,52
		<i>end-3</i>	22,66			23,86
	L4440 (kontrola)	<i>mab-5</i>	28,15	23,75	1,00	28,15
		<i>lin-39</i>	27,62			27,62
		<i>end-1</i>	32,84			32,84
		<i>end-3</i>	24,14			24,14
III.	7388 (pokus)	<i>mab-5</i>	28,78	23,27	1,00	28,78
		<i>lin-39</i>	28,00			28,00
		<i>end-1</i>	30,75			30,75
		<i>end-3</i>	22,86			22,86
	L4440 (kontrola)	<i>mab-5</i>	29,70	23,25	1,00	29,70
		<i>lin-39</i>	28,48			28,48
		<i>end-1</i>	30,86			30,86
		<i>end-3</i>	24,07			24,07

Pro porovnání změny exprese genů *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* vlivem inhibice genu *R03E1.2*, byl vypočten rozdíl normalizovaných hodnot cP (cP_{norm.}) zjištěných pro jednotlivé geny v kontrolní populaci *C. elegans* (L4440) a v populaci vystavené RNAi (7388). Rozdíl cP (ΔcP) pro jednotlivé geny byl vypočten podle rovnice 6. V tab. 11 jsou uvedeny průměrné hodnoty ΔcP zjištěné pro geny *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* a směrodatné odchylky daných hodnot.

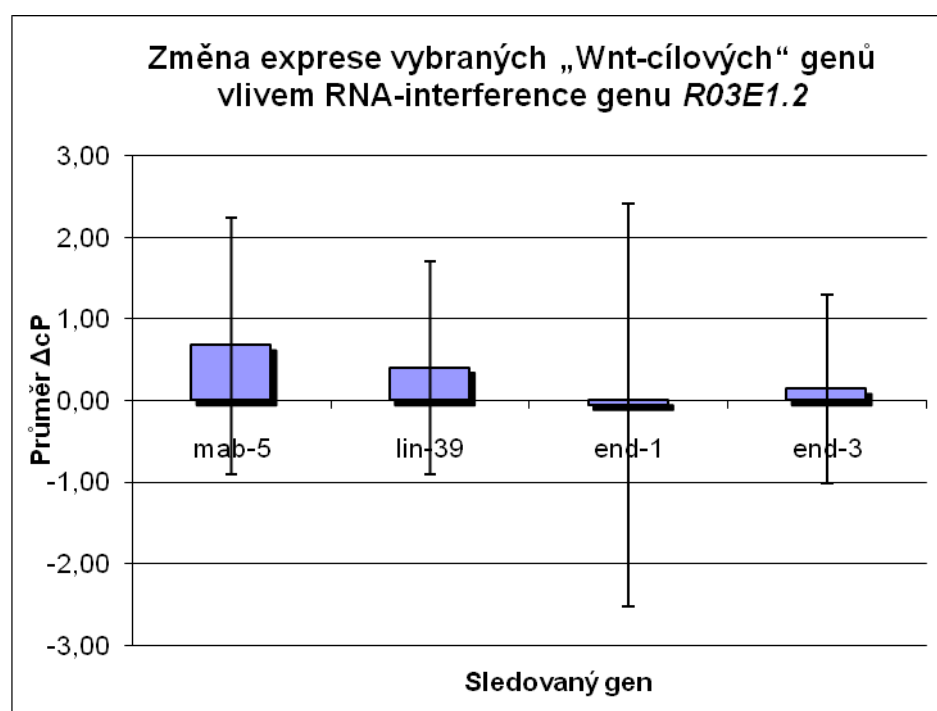
Rovnice 6: Výpočet ΔcP .

$$\Delta cP = cP_{\text{norm.}}(L4440) - cP_{\text{norm.}}(7388)$$

Tab. 11: Hodnoty ΔcP zjištěné pro geny *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* ve třech nezávislých experimentech; průměr ΔcP a směrodatná odchylka průměru ΔcP (σ) zjištěného během těchto tří experimentů.

Gen	ΔcP			Průměr ΔcP	σ
	I.	II.	III.		
<i>mab-5</i>	2,10	-1,01	0,92	0,67	1,57
<i>lin-39</i>	1,66	-0,95	0,48	0,40	1,31
<i>end-1</i>	-2,60	2,32	0,11	-0,06	2,47
<i>end-3</i>	-1,08	0,28	1,21	0,14	1,15

Na obr. 33 je uveden graf, v němž jsou uvedeny průměrné hodnoty ΔcP pro stanovované geny. Tento graf vyjadřuje, jakým způsobem se mění exprese „Wnt-cílových genů“ *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* vlivem inhibice genu *R03E1.2* pomocí RNAi. Vzhledem k vysoké směrodatné odchylce jednotlivých hodnot však z tohoto výsledku nelze vyvodit jednoznačný závěr a metoda bude muset být dále optimalizována.



Obr. 33: Průměr hodnot ΔcP zjištěných pro geny *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3*. Chybové úsečky uvádí směrodatnou odchylku průměru ΔcP zjištěného během tří provedených experimentů.

5. Diskuse

Tato diplomová práce se zabývá studiem homologu proreninového receptoru (PRR) v modelovém organismu *C. elegans*. Homolog PRR nese v *C. elegans* označení *R03E1.2* a identifikován byl na základě sekvenční podobnosti s lidským PRR pomocí softwaru BLAST (14). Gen *R03E1.2* nebyl v organismu *C. elegans* doposud nikým studován.

V lidském organismu je renin-angiotensionový systém (RAS) jedním z hlavních tělesných mechanismů pro regulaci krevního tlaku. Renin hraje v této kaskádě důležitou roli, protože je enzymem katalyzujícím rychlost limitující reakci celé kaskády. Po navázání proreninu na jeho receptor však dochází též k aktivaci intracelulárních mitogen-aktivovaných protein-kinas (MAPK) označovaných jako ERK-1 a ERK-2 (z angl. „extracellular signal-regulated kinase“). Za určitých podmínek vede aktivace proreninového receptoru k nefropatii vyvolané pouze působením MAPK a nikoliv komponentami RAS (17), (26). Poměrně překvapivě byl v lidských mesangiálních buňkách, octomilce a embryích drápatky PRR identifikován jako komponenta buněčné signalizace Wnt (56), (57). Fosforylace, respektive aktivace protein-kinas, hraje důležitou úlohu i ve Wnt signalizaci. Fosforylace Wnt-koreceptoru LRP-6 (z angl. „low density lipoprotein receptor-related protein 6“) totiž vede ke stabilizaci cytoplazmatického β -kateninu, který následně putuje do jádra, kde spouští transkripci „Wnt-cílových“ genů. Proreninový receptor byl rovněž identifikován jako kofaktor vakuolární H^+ -ATPasy (V-ATPasa) (56), (58). Lze tedy předpokládat, že se v živočišném organismu PRR účastní přenosu buněčného signálu na membránové úrovni, který je spojen s fosforylací dalších intracelulárních proteinů. V organismu *C. elegans* je exprese homologu PRR spolu s expresí dalších patnácti V-ATPas regulována pomocí jaderného receptoru NHR-31 (60). Lidský PRR a *R03E1.2* jsou sekvenčně identické z 23 %, přičemž nejvyššího stupně homologie dosahuje intracelulární a transmembránová doména, které byly u lidského PRR objeveny jako esenciální pro přenos Wnt-signálu (56). Extracelulární renin-vážíci doména je evolučně nejmladší a objevuje se až u vyšších živočichů (20). Ligand tohoto receptoru není u *C. elegans* (stejně jako u octomilky a drápatky) dosud znám.

V rámci této diplomové práce byla sledována relativní exprese homologu PRR, genu *R03E1.2*, v jednotlivých vývojových stádiích *C. elegans* na úrovni mRNA metodou kvantitativní PCR. Bylo zjištěno, že exprese *R03E1.2* je během embryonálního vývoje *C. elegans* a v dospělosti přibližně stejná. V průběhu larválního vývoje *C. elegans* se však exprese *R03E1.2* přibližně trojnásobně zvyšuje. Nejvyšší úroveň exprese genu *R03E1.2* je dosaženo v larválním stádiu L2, kdy je jeho exprese v porovnání s expresí v embryích a v dospělých téměř čtyřnásobná.

Lokalizace tkáňové exprese proteinu R03E1.2 byla určena s využitím linií *C. elegans*, exprimujících tento protein s fluorescenční značkou v podobě zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Sledovány byly tři linie *C. elegans*, nesoucí vektor pPD95.75 (bezprostorový vektor obsahující sekvenci pro fluorescenční protein), do něhož byl vložen gen *R03E1.2* spolu s promotorovými úseky tohoto genu o délce 1842, 2167 a 2759 pb. U všech tří linií byl fluorescenční signál pozorován ve stejné tkáni.

Expres proteinu R03E1.2 začíná během embryogeneze *C. elegans* ve stádiu tzv. „dvou ohybů“ v cytoplasmatické membráně šestice neuronů nacházejících se v anteriorní části těla. Během larválního vývoje a v dospělosti fluorescenční signál pozorovaný v těchto buňkách slábne. Vzhledem k poloze a tvaru buněk se dá předpokládat, že se jedná o neurony zpracovávající vnější chemické signály. Protože se však v hlavě hádátka nachází velké množství různě specializovaných nervových buněk, bude pro určení, o které konkrétní neurony se jedná, pravděpodobně nutné využití konfokální mikroskopie.

Ve stádiu embryonálního vývoje *C. elegans* označovaném jako tzv. „tři ohyby“, je již zformována většina anatomických struktur včetně trávicí trubice. V tomto stádiu je kromě již zmíněných neuronů možné pozorovat expresi proteinu R03E1.2 také v apikální membráně a cytoplasmě enterocytů. Expres proteinu R03E1.2 v apikální membráně trávicí trubice, cytoplasmě enterocytů a několika neuronech hlavy je pozorovatelná během celého larválního vývoje až do dospělosti. To, že je exprese proteinu R03E1.2 pozorovaná v cytoplasmatické membráně, je ve shodě s předpokladem, že by tento protein jakožto homolog PRR, měl být transmembránový protein. V další práci je plánováno určit přesnou funkci neuronů, v nichž je protein R03E1.2 exprimován. Vzhledem k tomu, že exprese genu *R03E1.2* by měla být regulována pomocí jaderného hormonálního receptoru 31

(NHR-31), důležitého pro překonání osmotického stresu, soudíme, že by mohlo jít o chemoreceptory, kterými *C. elegans* zaznamenává koncentraci Na^+ (60).

Výsledky qPCR i GFP expresní studie jsou podpořeny výsledky funkční studie prováděné *in vivo* umlčováním exprese studovaného genu metodou tzv. RNA interference (RNAi). RNAi byla prováděna buď kultivací hád'átek na bakteriální kultuře produkující dvouvláknovou RNA (dsRNA), nebo injikováním dsRNA připravené *in vitro* přímo do gonád dospělých hermafroditů. Pomocí RNAi bylo zjištěno, že gen *R03E1.2* je nezbytný pro časný larvální vývoj.

Při kultivaci *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dsRNA inhibující gen *R03E1.2* bylo na jejich potomstvu pozorováno opoždění vývoje oproti kontrolní populaci o přibližně jedno larvální stádium. V závislosti na teplotě, při níž byla hád'átka kultivována, byla zaznamenána též embryonální a larvální letalita. Embryonální letalita v populaci kultivované při 24 °C se prakticky nelišila od embryonální letality v populaci kontrolní (cca 1 %). Larvální letalita v populaci kultivované při 24 °C byla u RNAi i kontroly pod 1 %. Pokud však byla hád'átka vystavená RNAi kultivována při teplotě 16 °C, embryonální letalita byla 3,5 % (v kontrolní populaci 1 %). Larvální letalita u populace kultivované při nižší teplotě dosahovala však až 10 % (v kontrolní populaci byla pod 1 %).

Vlivem injikování dsRNA inhibující transkripci genu *R03E1.2* do gonád dospělých hermafroditů *C. elegans* dochází u jejich potomstva k významným vývojovým poruchám. V populaci *C. elegans* kultivované při 24 °C dosahuje embryonální letalita 8 %, larvální vývoj je zpomalen ve stádiu L1 až L2 a v tomto stádiu zahyne 71 % populace. U těchto larev je pozorován vznik vakuol, tzv. „dumpy“ fenotyp (larvy jsou kratší a silnější), zpomalení pohybu a „pumpování“ potravy do jícnu, dále zvýraznění obvodu trávicí trubice a dezintegrace střevních buněk. Larvy, přežívající po dobu alespoň pěti dní, jsou schopny se následně vyvinout do dospělosti a produkovat potomstvo, u kterého nebyly pozorovány žádné vývojové změny.

Neočekávaným zjištěním je negativní vliv nižší teploty na larvy vystavené RNAi genu *R03E1.2*. Embryonální letalita pozorovaná v populaci kultivované při 16 °C je 14 %, larvální pak 84 %. Vývoj je u některých jedinců navíc zastaven ve stádiích L1/L2 až po

dobu dvou týdnů. Tyto larvy nejeví typické znaky fenotypu „dauer“, tedy fakultativní diapauzy, do níž *C. elegans* vstupuje v nevhodných životních podmínkách. Podmínky kultivace byly navíc po celou dobu konstantní, tudíž není jasné, co je pro jedince *C. elegans*, jejichž vývoj je vlivem RNAi zastaven během larválního vývoje impulsem pro pokračování v normálním vývoji.

V experimentech prováděných s hád'átky vystavenými RNAi, jež byla kultivována při různých teplotách, je nižší teplota z hlediska vývoje zpravidla popisována jako pozitivní faktor. Tato skutečnost je zdůvodňována tím, že vývoj *C. elegans* probíhá při nižší teplotě pomaleji a reparační mechanismy mají tudíž dostatek času na kompenzaci ztráty funkce jednoho genu.

Injikováním dsRNA inhibující gen *R03E1.2* do linie *C. elegans* 7272, v níž je proteinový produkt tohoto genu exprimován s fluorescenční značkou v podobě GFP bylo potvrzeno, že pomocí použité dsRNA dochází ke specifické inhibici studovaného genu. U jedinců vystavených RNAi genu *R03E1.2* dochází ke snížení pozorovaného fluorescenčního signálu. Dále je pozorováno abnormální rozložení jinak rovnoměrné exprese proteinu *R03E1.2* v apikální membráně trávicí trubice. V některých částech střeva dochází ke vzniku vakuol a označené enterocyty ztrácejí svůj typický oválný tvar.

Kromě toho, že ve střevě *C. elegans* probíhá trávení živin a jejich vstřebávání, slouží střevo u *C. elegans* také jako hlavní biotransformační orgán, úložiště zásobních látek i toxinů a podílí se na produkci oocytů. Střevo, respektive procesy, které v něm probíhají, jsou také hlavním pojítkem mezi metabolismem a vývojem organismu. Škála procesů, na kterých tento orgán participuje, je tím pádem velmi široká.

Vzhledem k lokalizaci exprese proteinu *R03E1.2* v apikální membráně lumen střeva, je pro další práci vhodné využít konfokální elektronovou mikroskopii. S její pomocí by mohlo být určeno, zda vlivem RNAi genu *R03E1.2* dochází k poškození struktury mikrokloků nacházejících se na apikálním povrchu enterocytů, nebo zda dochází k jiným morfologickým defektům, které v konečném důsledku vedou k narušení vývoje celého organismu.

Vzhledem k průkazu účasti PRR v buněčné signalizaci Wnt v lidských mesangiálních buňkách, octomilce a embryích drápatky bylo jedním z cílů této práce zjistit, zda se homolog PRR, tedy gen *R03E1.2*, účastní signální dráhy Wnt i v organismu *C. elegans*. Za tímto účelem byly metodou qPCR sledovány změny exprese „Wnt-cílových“ genů *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* v populaci *C. elegans* vystavené inhibici genu *R03E1.2*. V populaci *C. elegans* byla inhibice genu *R03E1.2* navozena její kultivací na bakteriální kultuře produkující dsRNA při teplotě 16 °C.

Tento experiment byl prováděn celkem třikrát, avšak z důvodu příliš vysoké směrodatné odchylky průměrné hodnoty změny exprese sledovaných genů, se zatím nepodařilo potvrdit ani vyvrátit hypotézu o účasti genu *R03E1.2* v buněčné signalizaci Wnt v organismu *C. elegans*. V případě, že je pro vyvolání RNAi genu *R03E1.2* využita kultivace populace *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dsRNA inhibující gen *R03E1.2*, nedochází v této populaci k tak výrazným poruchám vývoje, jako v potomstvu *C. elegans*, do jejichž gonád byla vpravována dsRNA připravená *in vitro*. Proto se dá soudit, že k výrazným rozdílům oproti kontrolní populaci nedochází ani na úrovni transkripce genů, které jsou pomocí genu *R03E1.2* potencionálně regulovány. Metoda pro toto stanovení bude tudíž muset být dále optimalizována. Jako další možný přístup je zvažováno využití metody „microarray“, pomocí níž by bylo možné v populaci *C. elegans* vystavené RNAi genu *R03E1.2* sledovat změnu transkripce všech genů.

6. Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala studiem funkce homologu proreninového receptoru v organismu *C. elegans*. Příslušný gen nese označení *R03E1.2* a dosud nebyl v organismu *C. elegans* studován.

V rámci této práce byla metodou kvantitativní PCR (qPCR) sledována exprese *R03E1.2* během vývoje *C. elegans*. *R03E1.2* je exprimován během celého vývoje organismu, nejvíce však během larválního vývoje, kdy se exprese *R03E1.2* oproti embryonálnímu vývoji a dospělosti zvyšuje až čtyřnásobně.

Lokalizace tkáňové exprese proteinu R03E1.2 byla studována s využitím linií *C. elegans*, které tento protein exprimují s fluorescenční značkou v podobě zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Ukázalo se, že exprese R03E1.2 je zahájena v embryonálním stádiu tzv. „dvou ohybů“ v šesti neuronech hlavy. V embryonálním stádiu tzv. „tří ohybů“ je R03E1.2 exprimován v již vyvinuté apikální membráně trávicí trubice a cytoplasmě enterocytů. V cytoplasmě enterocytů, šesti neuronech hlavy a zejména pak v apikální membráně trávicí trubice, je fluorescenční signál vyvolaný expresí proteinu R03E1.2 pozorovatelný během celého vývoje organismu *C. elegans*.

Studium funkce genu *R03E1.2* bylo prováděno s využitím RNA-interference (RNAi), kdy se podařilo se prokázat, že *R03E1.2* je nezbytný pro larvální vývoj *C. elegans*. Ztráta funkce genu *R03E1.2* vyvolaná RNAi vede u *C. elegans* k embryonální a larvální letalitě, zpomalení larválního vývoje a morfologickým defektům, zejména pak poškození trávicí trubice. Míra poškození vývoje organismu závisí na metodě jakou je RNAi vyvolána a na teplotě, při níž jsou jedinci *C. elegans* vystaveni RNAi inkubováni. Injikováním dvouvláknové RNA (dsRNA) do gonád dospělých hermafroditů *C. elegans* je u jejich potomstva dosaženo silnější inhibice genu *R03E1.2*, než při jejich kultivaci na bakteriální kultuře produkující dsRNA. Dále bylo prokázáno, že nižší teplota kultivace je pro překonání stresu vyvolaného RNAi genu *R03E1.2* negativním faktorem.

Pomocí qPCR byly sledovány změny exprese „Wnt-cílových“ genů *mab-5*, *lin-39*, *end-1* a *end-3* mezi kontrolní populací *C. elegans* a populací vystavenou RNAi. RNAi byla navozena kultivací *C. elegans* na bakteriální kultuře produkující dsRNA. Kvůli vysokému rozptylu zjištěných hodnot se však nepodařilo prokázat ani vyvrátit hypotézu, že se protein R03E1.2 v organismu *C. elegans* účastní Wnt-signalizace.

7. Použitá literatura

1. Altun, Z. F., and Hall, D. H. (2009) Introduction, In *Worm Atlas.*, URL: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>, dne 15. 2. 2012
2. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* 263, 802-805.
3. Riddle, L. D., Blumenthal, T., Meyer, B. J., and Priess, J. R. (1997) Introduction to *C. elegans*, In *C. elegans II*, pp 1-22, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
4. Nelson, F. K., Albert, P. S., and Riddle, D. L. (1983) Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system, *J Ultrastruct Res* 82, 156-171.
5. Altun, Z. F., and Hall, D. H. (2009) Alimentary system, intestine., In *WormAtlas.* , URL: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/intestine/Intframeset.html>, dne 27. 3. 2012
6. Wood, W. B. (1988) Introduction to *C. elegans*, In *The nematode C. elegans*, pp 1-16, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
7. Wood, W. B. (1988) Embryology, In *The Nematode C. elegans*, pp 215-241, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
8. Riddle, D. L. (1988) The Dauer Larva, In *The Nematode C. elegans*, pp 393-412, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
9. Byerly, L., Cassada, R. C., and Russell, R. L. (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction, *Dev Biol* 51, 23-33.
10. Hodgkin, J. (1988) Sexual dimorphism and sex determination, In *The Nematode C. elegans*, pp 243-280, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
11. Karagiannis, T. C., and El-Osta, A. (2004) siRNAs: mechanism of RNA interference, in vivo and potential clinical applications, *Cancer Biol Ther* 3, 1069-1074.
12. Paroo, Z., Liu, Q., and Wang, X. (2007) Biochemical mechanisms of the RNA-induced silencing complex, *Cell Res* 17, 187-194.
13. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., and Rodwell, V. W. (2003) The Diversity of the Endocrine System, In *Harper's Illustrated Biochemistry* 26 ed., pp 434-455, The McGraw-Hill Companies, Inc. .

14. Zima, V. (2008) Homolog (pro)reninového receptoru v modelovém organismu *Caenorhabditis elegans*, In *Přírodovědecká fakulta*, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
15. Griendling, K. K., Murphy, T. J., and Alexander, R. W. (1993) Molecular biology of the renin-angiotensin system, *Circulation* 87, 1816-1828.
16. Sealey, J. E., White, R. P., Laragh, J. H., and Rubin, A. L. (1977) Plasma prorenin and renin in anephric patients, *Circ Res* 41, 17-21.
17. Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T., and Sraer, J. D. (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin, *J Clin Invest* 109, 1417-1427.
18. Schmitz, C., Gotthardt, M., Hinderlich, S., Leheste, J. R., Gross, V., Vorum, H., Christensen, E. I., Luft, F. C., Takahashi, S., and Willnow, T. E. (2000) Normal blood pressure and plasma renin activity in mice lacking the renin-binding protein, a cellular renin inhibitor, *J Biol Chem* 275, 15357-15362.
19. Saris, J. J., Derkx, F. H., De Bruin, R. J., Dekkers, D. H., Lamers, J. M., Saxena, P. R., Schalekamp, M. A., and Jan Danser, A. H. (2001) High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1706-1715.
20. Burckle, C., and Bader, M. (2006) Prorenin and its ancient receptor, *Hypertension* 48, 549-551.
21. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
22. Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., and Lopez, R. (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI, *Nucleic Acids Res* 38, W695-699.
23. Nguyen, G., Burckle, C. A., and Sraer, J. D. (2004) Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance, *Curr Hypertens Rep* 6, 129-132.
24. Huang, Y., Border, W. A., and Noble, N. A. (2007) Functional renin receptors in renal mesangial cells, *Curr Hypertens Rep* 9, 133-139.
25. Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades, *Adv Cancer Res* 74, 49-139.

26. Ichihara, A., Suzuki, F., Nakagawa, T., Kaneshiro, Y., Takemitsu, T., Sakoda, M., Nabi, A. H., Nishiyama, A., Sugaya, T., Hayashi, M., and Inagami, T. (2006) Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice, *J Am Soc Nephrol* 17, 1950-1961.
27. Ichihara, A., Kaneshiro, Y., and Suzuki, F. (2006) Prorenin receptor blockers: effects on cardiovascular complications of diabetes and hypertension, *Expert Opin Investig Drugs* 15, 1137-1139.
28. Eisenmann, D. M. (25. 6. 2005) Wnt signaling, In *WormBook* (Community, T. C. e. R., Ed.). , URL: http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html, dne 13. 3. 2012
29. Wodarz, A., and Nusse, R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development, *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59-88.
30. Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila, *Nature* 287, 795-801.
31. Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987) The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless, *Cell* 50, 649-657.
32. Nusse, R., and Varmus, H. E. (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome, *Cell* 31, 99-109.
33. Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer, *Genes Dev* 14, 1837-1851.
34. He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, *Science* 281, 1509-1512.
35. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522-5527.
36. Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., and Clevers, H. (1999) Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1, *Science* 285, 1923-1926.
37. Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease, *Cell* 127, 469-480.

38. Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature* 382, 638-642.
39. van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., and Clevers, H. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells, *Cell* 111, 241-250.
40. He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way, *Development* 131, 1663-1677.
41. Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005) Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction, *Nature* 438, 867-872.
42. Cadigan, K. M., and Peifer, M. (2009) Wnt signaling from development to disease: insights from model systems, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002881.
43. Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R., and Moon, R. T. (2000) The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape, *Trends Genet* 16, 279-283.
44. Veeman, M. T., Axelrod, J. D., and Moon, R. T. (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling, *Dev Cell* 5, 367-377.
45. Ruvkun, G., and Hobert, O. (1998) The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*, *Science* 282, 2033-2041.
46. Korswagen, H. C., Herman, M. A., and Clevers, H. C. (2000) Distinct beta-catenins mediate adhesion and signalling functions in *C. elegans*, *Nature* 406, 527-532.
47. Han, M. (1997) Gut reaction to Wnt signaling in worms, *Cell* 90, 581-584.
48. Kenyon, C. (1986) A gene involved in the development of the posterior body region of *C. elegans*, *Cell* 46, 477-487.
49. Whangbo, J., and Kenyon, C. (1999) A Wnt signaling system that specifies two patterns of cell migration in *C. elegans*, *Mol Cell* 4, 851-858.
50. Kornfeld, K. (1997) Vulval development in *Caenorhabditis elegans*, *Trends Genet* 13, 55-61.

51. Eisenmann, D. M., Maloof, J. N., Simske, J. S., Kenyon, C., and Kim, S. K. (1998) The beta-catenin homolog BAR-1 and LET-60 Ras coordinately regulate the Hox gene *lin-39* during *Caenorhabditis elegans* vulval development, *Development* 125, 3667-3680.
52. Goldstein, B. (1993) Establishment of gut fate in the E lineage of *C. elegans*: the roles of lineage-dependent mechanisms and cell interactions, *Development* 118, 1267-1277.
53. Maduro, M. F., Lin, R., and Rothman, J. H. (2002) Dynamics of a developmental switch: recursive intracellular and intranuclear redistribution of *Caenorhabditis elegans* POP-1 parallels Wnt-inhibited transcriptional repression, *Dev Biol* 248, 128-142.
54. Lin, R., Thompson, S., and Priess, J. R. (1995) *pop-1* encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos, *Cell* 83, 599-609.
55. Shin, T. H., Yasuda, J., Rocheleau, C. E., Lin, R., Soto, M., Bei, Y., Davis, R. J., and Mello, C. C. (1999) MOM-4, a MAP kinase kinase kinase-related protein, activates WRM-1/LIT-1 kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*, *Mol Cell* 4, 275-280.
56. Bilic, J., Huang, Y. L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C. M., Bienz, M., and Niehrs, C. (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation, *Science* 316, 1619-1622.
57. Buechling, T., Bartscherer, K., Ohkawara, B., Chaudhary, V., Spirohn, K., Niehrs, C., and Boutros, M. (2010) Wnt/Frizzled signaling requires dPRR, the *Drosophila* homolog of the prorenin receptor, *Curr Biol* 20, 1263-1268.
58. Ludwig, J., Kerscher, S., Brandt, U., Pfeiffer, K., Getlawi, F., Apps, D. K., and Schagger, H. (1998) Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules, *J Biol Chem* 273, 10939-10947.
59. Nishi, T., and Forgac, M. (2002) The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 94-103.
60. Hahn-Windgassen, A., and Van Gilst, M. R. (2009) The *Caenorhabditis elegans* HNF4alpha Homolog, NHR-31, mediates excretory tube growth and function through coordinate regulation of the vacuolar ATPase, *PLoS Genet* 5, e1000553.

61. Van Gilst, M., Gissendanner, C. R., and Sluder, A. E. (2002) Diversity and function of orphan nuclear receptors in nematodes, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 12, 65-88.
62. Robinson-Rechavi, M., Maina, C. V., Gissendanner, C. R., Laudet, V., and Sluder, A. (2005) Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes, *J Mol Evol* 60, 577-586.
63. Kostrouchova, M., Krause, M., Kostrouch, Z., and Rall, J. E. (1998) CHR3: a *Caenorhabditis elegans* orphan nuclear hormone receptor required for proper epidermal development and molting, *Development* 125, 1617-1626.
64. Brozova, E., Simeckova, K., Kostrouch, Z., Rall, J. E., and Kostrouchova, M. (2006) NHR-40, a *Caenorhabditis elegans* supplementary nuclear receptor, regulates embryonic and early larval development, *Mech Dev* 123, 689-701.
65. Simeckova, K., Brozova, E., Vohanka, J., Pohludka, M., Kostrouch, Z., Krause, M. W., Rall, J. E., and Kostrouchova, M. (2007) Supplementary nuclear receptor NHR-60 is required for normal embryonic and early larval development of *Caenorhabditis elegans*, *Folia Biol (Praha)* 53, 85-96.
66. Kouns, N. A., Nakielna, J., Behensky, F., Krause, M. W., Kostrouch, Z., and Kostrouchova, M. (2011) NHR-23 dependent collagen and hedgehog-related genes required for molting, *Biochem Biophys Res Commun* 413, 515-520.
67. http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00000123#081c-9e3-3., dne 17. 3. 2012

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka